



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Profesional Química

**Estudio químico y biológico de extractos de la hoja de
tara (*Caesalpinia spinosa*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico

AUTOR

Rosa Natalie AVILÉS OCHANTE

ASESOR

Dr. Julio César SANTIAGO CONTRERAS

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Avilés, R. (2018). *Estudio químico y biológico de extractos de la hoja de tara (Caesalpinia spinosa)*. Tesis para optar el título profesional de Químico. Escuela Profesional de Ingeniería Química, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima 1

“Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional”

“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Química, bajo la Presidencia del **Mg. Olivio Nino Castro Mandujano** (Presidente), la **Quím. Juana María Huamán Malla** (Miembro) y el **Dr. Julio César Santiago Contreras** (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS**, titulada “**Estudio químico y biológico de extractos de la hoja de tara (Caesalpinia Spinosa)**”, después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborado por la Bachiller en Química: **Rosa Natalie Avilés Ochante**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL de QUÍMICA**, acordaron calificarlo con la **NOTA** de:

DIECIOCHO

(LETRA)

18

(NÚMERO)

Ciudad Universitaria, 16 de noviembre de 2018.

Mag. OLIVIO NINO CASTRO MANDUJANO
PRESIDENTE

Quím. JUANA MARÍA HUAMÁN MALLA
MIEMBRO

Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS
ASESOR

Dra. THAIS CLEOFÉ LINARES FUENTES
DIRECTORA (e) DE LA E.P. DE QUÍMICA



HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional):

Código Orcid del asesor (dato obligatorio): **0000 – 0002 – 1905 - 7029**

DNI del autor: **10809544**

Grupo de investigación: **Biomateriales y Productos Naturales: Química y Aplicaciones**

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas

Ciudad Universitaria - Lima

Año o rango de años que la investigación abarcó: **2015 - 2016**

Agradecimientos

A Dios, por dame la vida e iluminar mi camino siempre.

A mis padres Vladimir y Zonia, por darme la vida. A mi padre con su amor y sacrificio supo guiarme, darme valores, principios; gracias por creer en mí y darme la oportunidad de alcanzar mis metas.

A mi abuelo Ruperto, a mis tíos Zoya, German, Iván, Victoria, Marielena, a toda mi familia Avilés, en especial a mí tío Goric Avilés, porque siempre me brindó su apoyo económico en el transcurso de mi carrera y a mi abuelita materna Teófila por su inmenso amor.

Al padre de mis hijos Jaime Peña por su apoyo constante, a mis hijos Samuel e Ismael por ser los motores y motivos para culminar la tesis, comprender mi ausencia; a mi suegra Nazaria, a mi hermano Anthony quien me ayudó en las etapas más críticas de la carrera con su apoyo incondicional, a mis cuñados Adrián, Nelly a mis sobrinos Diego, Gianella y a Gladys Salazar por ayudarme a cuidar de mis hijos; gracias familia por tanto cariño y apoyo.

Al Dr. Julio Santiago, mi asesor, mi más sincero agradecimiento por brindarme su apoyo, paciencia y consejos que permitieron la culminación de la tesis.

- A las Profesora Nancy Rojas que desarrollo una parte importante de la tesis que es la evaluación de actividad cicatrizante en el tratamiento de quemaduras, su apoyo, su entrega en cada trabajo realizado, su cariño incondicional de siempre; y a la profesora Juana Huamán, por su cariño, apoyo, ayuda y constante colaboración en el desarrollo de la tesis.

Al Prof. Jorge León y a sus alumnas investigadoras, por la colaboración en el desarrollo de la parte biológica. A Nadia Galindo, Ulrike Tarazona y a todas chicas del Laboratorio de Ecología Microbiana.

En la caracterización, al Dr. Aldo Guzmán por su apoyo y facilidades en el uso del espectrofotómetro UV- VIS; al Prof. Marco Guerrero, por el préstamo de material de vidrio y por los consejos para el término de esta tesis; al Dr. Alcides López, por ayuda en el análisis de DRX; y a Justo Carrión, por brindarme los conocimientos de actividad antioxidante, polifenoles.

En la parte estadística: a Fernando Laza, un amigo que, con sus conocimientos en estadística y controles de calidad, ayudó a resolver mis dudas; y a Lourdes Mamani, por su apoyo con el análisis estadístico, a María Malásquez por su apoyo en la corrección de toda la tesis mil gracias, a Jorge Cabrera su apoyo en la parte estadística del tratamiento de quemaduras de los conejos.

A mi alma mater UNMSM un profundo agradecimiento, en especial a mi facultad de Química, al departamento de Orgánica, gracias LIDQO; y a USAQ por el análisis IR, especialmente a Juan Ramón.

Finalmente, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos aquellos conocidos, amigos que de mil formas contribuyeron a que esta tesis llegue a buen término.

Dedicatoria

A mi padre Vladimir Avilés y a mis hijos,
Samuel e Ismael mis tesoros regalos de Dios.

Resumen Ejecutivo

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo estudiar la fitoquímica de los extractos de las hojas de la tara (*Caesalpinia spinosa*), cuantificar los principales metabolitos secundarios (polifenoles, taninos) y determinar la actividad antioxidante, antimicrobiana, y cicatrizante de dichos extractos. El conocimiento de estos análisis será trascendental para evaluar su potencial aplicación como cicatrizante en el tratamiento de quemaduras.

Los extractos fueron conseguidos a partir de las hojas de tara, utilizando etanol, metanol y una mezcla hidroalcohólica como solventes, a distintas temperaturas. En el análisis fitoquímico se encontró taninos en mayor cantidad que saponinas y flavonoides. La actividad antioxidante de los extractos de la hoja de tara a diferentes temperaturas y con sus respectivos solventes fue evaluada por el método de *Brand-Williams*, método de neutralización del radical DPPH. Se observó que el extracto etanólico a 80 °C presentó la mayor capacidad antioxidante ($IC_{50} = 6,325 \mu\text{g/mL}$). En los otros extractos el IC_{50} varía entre 19,16 y 452,45 $\mu\text{g/mL}$.

La determinación de polifenoles totales se realizó por el método colorimétrico, utilizando el reactivo de *Folin-Ciocalteu*. Se observó que el extracto que contiene la mayor cantidad de polifenoles es el obtenido con metanol a 80 °C (476,45 mg EAG/g de muestra). En los otros extractos el contenido de polifenoles varía entre 219 y 409 mg EAG/g de muestra.

La determinación de taninos se realizó por el método del tungsto-molibdico-fosfórico. El extracto metanólico a 50 °C fue el que presentó mayor porcentaje de taninos totales (18,0%), de taninos hidrolizables (16,2%), y taninos no hidrolizables (1,8%).

En las pruebas de actividad antimicrobiana, los extractos mostraron actividad inhibitoria sólo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, mas no así frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. El extracto etanólico a 80 °C y

el metanólico a 70 °C mostraron mayor actividad bactericida, con halos de inhibición de 17 mm. Los otros extractos mostraron halos de 11 mm. En la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI), los extractos etanólicos, a 50 °C y 80°C, mostraron mayor actividad bactericida, con una CMI de 12,5 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. Todos los demás extractos tuvieron un CMI de 25 µg/mL.

Finalmente, se determinó que los extractos de las hojas de tara no mostraron diferencias significativas en la cicatrización de quemaduras, en comparación con la furacina (crema comercial) y extracto de hojas de tara incorporadas en un hidrogel, pero si fue superior al grupo que no recibió tratamiento.

Abstract

The objective of this thesis is to study the phytochemistry of tara (*Caesalpinia spinosa*) leaf extracts, to quantify the main secondary metabolites (polyphenols, tannins) and to determine the antioxidant, antimicrobial, and healing activities of those extracts. The knowledge of these analyzes will be transcendental to evaluate its potential application as a healer in the treatment of burns.

The extracts were obtained from the tara leaves, using ethanol, methanol and a hydroalcoholic mixture as solvents, at different temperatures. In the phytochemical analysis, tannins were found in greater quantity than saponins and flavonoids.

The antioxidant activity of tara leaf extracts at different temperatures and with their respective solvents was evaluated by the Brand-Williams method, DPPH radical neutralization method. The highest antioxidant capacity was observed in the extract obtained with ethanol at 80 °C ($IC_{50} = 6.33 \mu\text{g/mL}$). In the other extracts, the IC_{50} varies between 19.16 and 430.05 $\mu\text{g/mL}$.

The determination of phenols was carried out by the Folin-Ciocalteu colorimetric method. It was observed that the extract containing the highest number of polyphenols is that obtained with methanol at 50 °C (477.36 mg EAG/g sample). In the other extracts, the polyphenol content varies between 457.36 and 423.72 mg EAG/g of sample.

The determination of tannins was carried out by the tungsto-molybdic-phosphoric method. Methanolic extract at 50 °C has the highest percentage of total tannins (18.0%), hydrolysable tannins (16.2%), and non-hydrolysable tannins (1.8%).

In the antimicrobial activity tests, the extracts showed inhibitory activity only against *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, but not against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. The ethanolic extracts at 80 °C and the methanolic one at 70 °C showed greater bactericidal activity, with halos of inhibition of 17 mm. The

other extracts showed 11 mm halos. In the minimum inhibitory concentration (MIC) test, ethanolic extracts at 50 °C and 80 °C showed higher bactericidal activity, with a MIC of 12.5 µg/mL against *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. All other extracts had a MIC of 25 µg/mL.

The extracts of the tara leaves did show significant differences in the healing of burns, in comparison with the furacin (commercial cream) and extract of tara leaves incorporated in a hydrogel.

Tabla de Contenidos

Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tablas	viii
Capítulo I: Introducción.....	1
1.1. Objetivos de la Investigación	2
1.1.1. Objetivo general.....	2
1.1.2. Objetivos Específicos.....	2
1.2. Justificación del Trabajo.....	2
1.3. Hipótesis	2
1.4. Antecedentes.....	3
Capítulo II: Generalidades.....	4
2.1. Tara.....	4
2.1.1. Descripción botánica de la Tara.....	5
2.2. Metabolitos Secundarios.....	6
2.2.1. Compuestos fenólicos	7
2.2.2. Taninos.....	9
2.2.3. Determinación de compuestos fenólicos totales	12
2.2.4. Determinación de taninos totales	13
2.3. Antioxidantes.....	13
2.3.1. Radicales libres	14
2.3.2. Determinación de la actividad antioxidante.....	15
2.4. Hidrogeles.....	16
2.4.1. Características de los hidrogeles	17
2.4.2. Obtención de hidrogeles mediante radiación gamma	17
2.4.3. Aplicaciones de los hidrogeles.....	18

2.4.4.	Quitosano	18
2.4.5.	Alcohol polivinílico (PVA).....	18
2.5.	Técnicas de Caracterización	19
2.5.1.	Espectroscopia FT-IR	19
2.5.2.	Espectrofotometría UV-Vis	22
2.5.3.	Difracción de Rayos X (DRX).....	24
2.6.	Actividad Antimicrobiana	26
2.7.	Actividad Cicatrizante	27
Capítulo III: Parte Experimental		28
3.1.	Reactivos, Materiales y Equipos	28
3.1.1.	Reactivos.....	28
3.1.2.	Materiales.....	28
3.1.3.	Equipos	28
3.2.	Acondicionamiento de la Materia Prima	28
3.2.1.	Tratamiento de las hojas de tara.....	28
3.2.2.	Obtención del polvo fino	29
3.2.3.	Obtención de extracto de las hojas.....	29
3.3.	Determinación de la Actividad Antioxidante	29
3.4.	Determinación de Compuestos Fenólicos Totales.....	30
3.5.	Determinación de Taninos Totales	31
3.6.	Screening Fitoquímico.....	32
3.6.1.	Saponinas	32
3.6.2.	Flavonoides	33
3.6.3.	Taninos.....	33
3.7.	Preparación de Hidrogeles.....	34

3.8.	Espectroscopia FT IR	35
3.9.	Difracción de Rayos X en Polvo	35
3.10.	Actividad Antimicrobiana	35
3.11.	Concentración Mínima Inhibitoria	36
3.12.	Evaluación <i>in vivo</i> de la Cicatrización de Heridas Provocadas por Quemadura...	37
Capítulo IV: Resultados y Discusión de Resultados		38
4.1.	Obtención del Extracto de las Hojas de Tara	38
4.2.	Determinación de la Actividad Antioxidante	38
4.3.	Determinación de Compuestos Fenólicos Totales Folin-Ciocalteau.....	40
4.4.	Determinación de Taninos Totales	42
4.5.	Screening Fitoquímico.....	43
4.6.	FT-IR	44
4.7.	Difracción de Rayos X	49
4.8.	Actividad Antimicrobiana	51
4.9.	Concentración Mínima Inhibitoria	52
4.10.	Actividad Cicatrizante	54
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones.....		59
5.1.	Conclusiones.....	59
5.2.	Recomendaciones	60
Referencias.....		61
Apéndices		68
Apéndice A: Obtención de Extractos de las Hojas de Tara		68
Apéndice B: Método de DPPH.....		69
Apéndice C: Polifenoles		69
Apéndice D: Determinación de Taninos Totales.....		70

Apéndice G: Actividad Cicatrizante	74
Apéndice H: Ejemplos de Cálculos de los Diferentes Métodos.....	75

Lista de Figuras

<i>Figura 1.</i>	Origen de algunos metabolitos secundarios.....	7
<i>Figura 2.</i>	Clasificación de compuestos fenólicos basados en Climent y Esteve (1997).	8
<i>Figura 3.</i>	Estructura química del ácido gálico, base de los taninos hidrolizables.	10
<i>Figura 4.</i>	Ejemplo de taninos hidrolizable (pentagaloilglucosa).	10
<i>Figura 5.</i>	Ejemplo de taninos condensados.	11
<i>Figura 6.</i>	Mecanismo de reacción del reactivo de Folin Ciocalteu	12
<i>Figura 7.</i>	Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin Ciocalteu	13
<i>Figura 8.</i>	Método del 2,2-difenil-1-1 picrilhidrazilo (DPPH).	16
<i>Figura 9.</i>	Unidad repetitiva de quitosano.	18
<i>Figura 10.</i>	Espectro electromagnético.	19
<i>Figura 11.</i>	Modelo Vibracional de un Enlace Covalente.	20
<i>Figura 12.</i>	Diferentes tipos de modo de vibración de la molécula del agua.....	21
<i>Figura 13.</i>	Diagrama de un Espectrofotómetro Infrarrojo.....	22
<i>Figura 14.</i>	Representación gráfica de la ley de Bragg.....	25
<i>Figura 15.</i>	Curva estándar de ácido gálico.	41
<i>Figura 16.</i>	Curva estándar de ácido tánico.	42
<i>Figura 17.</i>	Espectro IR del patrón de Galatonino.....	46
<i>Figura 18.</i>	Espectro IR del extracto etanólico a 50°C.	47
<i>Figura 19.</i>	Espectro IR del extracto metanólico a 50°C.	47
<i>Figura 20.</i>	Espectro IR del extracto etanólico a 80°C.	48
<i>Figura 21.</i>	Espectro IR del extracto metanólico a 70°C.	49
<i>Figura 22.</i>	Difractogramas del extracto de hojas de tara etanólico e hidroalcohólico a 50°C.....	50
<i>Figura 23.</i>	Difractograma del extracto de hojas de tara metanólico a 90°C.	50

<i>Figura 24.</i>	Difractogramas del extracto de hojas de tara etanólico a 50°C e hidroalcohólico a 90°C.....	50
<i>Figura 25.</i>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 versus extractos: (1) Etanol 50°C; (2) Etanol 70°C; (3) Etanol 80°C; (4) Metanol 50°C; (5) Metanol 70°C.....	51
<i>Figura 26.</i>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 versus extractos: (6) Metanol 80°C; (7) Hidroalcohólico 50°C; (8) Hidroalcohólico 70°C; (9) Hidroalcohólico 90°C; (DMSO 5%) control de no inhibición del solvente.	52
<i>Figura 27.</i>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 versus disco antibiótico de Estreptomicina (10 µg) como control de inhibición.	52
<i>Figura 28.</i>	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de hoja de tara frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922.	54
<i>Figura 29.</i>	Evolución de las áreas quemadas al día 7, 14 y 21 luego del tratamiento con PVA-Q-Extracto hidroalcohólico 80°C, PVA-Q-Soluc. Hidroalcohólica, solución de extracto hidroalcohólico 80°C, furacina y sin tratamiento.	56
<i>Figura 30.</i>	% Retracción vs Tratamiento.....	58

Lista de Tablas

Tabla 1	<i>Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno</i>	14
Tabla 2	<i>Rendimiento Porcentual de los Extractos de las Hojas de Tara a Diferentes Temperaturas</i>	38
Tabla 3	<i>Extracto de Hojas Tara: Actividad Antioxidante a Diferentes Temperaturas en Etanol</i>	39
Tabla 4	<i>Extracto de Hojas Tara: Actividad Antioxidante a Diferentes Temperaturas en Metanol</i>	39
Tabla 5	<i>Extracto de Hojas Tara: Actividad Antioxidante a Diferentes Temperaturas en Hidroalcohólico</i>	40
Tabla 6	<i>Concentración y Absorbancia para la Curva de Ácido Gálico - Método Folin-Ciocalteu</i>	41
Tabla 7	<i>Extracto de Hojas de Tara: Polifenoles a Diferentes Temperaturas en Etanol</i>	41
Tabla 8	<i>Extracto de Hojas de Tara: Polifenoles a Diferentes Temperaturas en Metanol</i> .	41
Tabla 9	<i>Extracto de Hojas de Tara: Polifenoles a Diferentes Temperaturas - Hidroalcohólico</i>	42
Tabla 10	<i>Concentración y Absorbancia para la Curva Estándar de Ácido Tánicos</i>	42
Tabla 11	<i>Contenido de Taninos de los Extractos de Hojas de Tara</i>	43
Tabla 12	<i>Resultado de Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de Hoja de Tara</i>	45
Tabla 13	<i>Extracto Etanólico a 50°C: Región de Frecuencia vs Grupos Funcionales del Espectro IR</i>	47
Tabla 14	<i>Extracto Metanólico a 50°C: Región de frecuencia vs grupos funcionales del espectro IR</i>	48
Tabla 15	<i>Extracto Etanólico a 80°C: Región de Frecuencia vs Grupos Funcionales del Espectro IR</i>	48

Tabla 16	<i>Extracto Metanólico a 70°C: Región de Frecuencia vs Grupos Funcionales del Espectro IR.....</i>	49
Tabla 17	<i>Actividad Antimicrobiana de Extractos de Hojas de Tara.....</i>	51
Tabla 18	<i>Concentración Mínima Inhibitoria de extractos de Hojas de Tara frente a Staphylococcus aureus ATCC 25922</i>	53
Tabla 19	<i>Actividad Antimicrobiana de Extractos de las Vainas de Tara (Avilés et al., 2010)</i>	54
Tabla 20	<i>Área Promedio de las Heridas al día 7,14 y 21 de Tratamiento con PVA-Q, - Solución Hidroalcohólica, PVA-Q-ET 80°C, ET 80 °C, Furacina y Sin Tratamiento</i>	55

Capítulo I: Introducción

La tara (*Caesalpinia spinosa*) es un árbol de origen peruano, que crece en forma silvestre en zonas secas, tanto en la región andina como en la costa peruana. Sus flores son de color amarillo rojizo dispuestas en racimos, sus frutos son vainas de color naranja entre 8 a 10 cm de largo que contienen de 4 a 7 granos de semilla redondeadas de 0,6 a 0,7 cm de diámetro cada una (De La Cruz, 2004).

En los últimos años, se ha incrementado la aplicación industrial de la tara, debido a que sus vainas son fuentes importantes de taninos; un compuesto fenólico que se utiliza en la industria como clarificador del vino, como sustituto de la malta en la elaboración de cerveza y como materia prima para la producción de ácido gálico que es utilizado como antioxidante en la industria de los aceites (De La Cruz, 2004). La tara, como fuente natural integral (tallo, hojas y frutos) es utilizada desde la época prehispánica en la medicina folclórica o popular como astringente, cicatrizante, antidisentérico y en el tratamiento de amigdalitis e infecciones bucales. También es utilizada como mordiente en teñidos (Reynel, 1990).

La mayoría de las investigaciones sobre aplicaciones de la tara se han realizado con extractos obtenidos de la vaina de la tara. Se sabe que el extracto acuoso de la vaina de la tara tiene actividad antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.* *Shigella flexnerii* (Araujo, 2003). En cambio, se demostró su actividad antiinflamatoria *in vivo* (Infantes, 2004). En contraste, los estudios científicos sobre el uso de extractos provenientes de las hojas de la tara son escasos. Se conoce el efecto toxicológico de las hojas de tara sobre el gorgojo del maíz (Iannacore, 2005) *fusarium solani* y *Phoma tarda* (Ferreira, 2005).

El presente trabajo contribuirá al conocimiento sobre los metabolitos presentes en los extractos de las hojas de tara, así como en sus potenciales aplicaciones.

1.1. Objetivos de la Investigación

1.1.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos acuosos, etanólico y metanólico de las hojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) y determinar la actividad cicatrizante de dichos extractos incluidos en hidrogel.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las hojas de tara.
- Determinar el efecto de la temperatura de extracción en el contenido de polifenoles y taninos totales.
- Evaluar el efecto de la temperatura de extracción en la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos.
- Preparar hidrogeles conteniendo extractos de las hojas de tara y evaluar su acción cicatrizante en el tratamiento de quemaduras.

1.2. Justificación del Trabajo

La investigación en plantas medicinales es un tema muy atractivo por su finalidad de obtener compuestos con actividad biológica y farmacológica. La tara es una de las especies que ha sido identificada como una de las más promisorias para la obtención de nuevos derivados y formulaciones con valor agregado. En tal sentido, el presente trabajo de investigación se concentra en dar a conocer las características de los extractos obtenidos a partir de las hojas de tara en función de las condiciones de extracción; sin dejar de lado la búsqueda de las posibles aplicaciones en diferentes campos, específicamente biomédica.

1.3. Hipótesis

Los extractos de las hojas de tara contienen metabolitos secundarios con actividad antioxidante y antimicrobiana que, sumado a las propiedades del quitosano presente en el

hidrogel, favorece la actividad cicatrizante de dichos extractos.

1.4. Antecedentes

Los extractos, en diferentes solventes, de la vaina de tara son conocidos por presentar buena actividad antimicrobiana. Por ejemplo, extractos acuosos de la vaina de tara mostraron buena actividad frente a *S. aureus* y *S. pyogenes*, (Cotrado, 2009) mientras que el extracto hexánico presenta actividad antifúngica (Ferreira, 2005). El extracto acuoso de vainas de tara mostró buena capacidad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* aislados de pacientes (Añanca, 2009). Las vainas de tara en cocimiento mostraron buena actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram positivo y Gram negativo, *Candida albicans*, *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* (López, 1998). En un ensayo clínico para el tratamiento de la gingivitis crónica con preparaciones de manera tradicional de vainas de *C. spinosa* “tara”, se demostró su eficacia al desaparecer los indicadores clínicos de la inflamación gingival por lo que se demostró con este ensayo la propiedad hemostática, antiséptica y antiinflamatoria (Rojas, 1998).

Los experimentos de cicatrización de quemaduras con hidrogeles de quitosano-PVA obtenidas por radiación gamma conteniendo extracto etanólico de tara proveniente de la vaina, inducen a una significativa retracción de la herida y aceleración del proceso de cicatrización en conejos, comparado con la acción del extracto etanólico de tara sólo, las películas de quitosano solo y la furacina (Rojas, 2010; Avilés, 2012).

El efecto biocida de extractos de *Caesalpinia spinosa* sobre adultos de *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Curculionidae) y *Stegobium paniceum* en bioensayos de mortandad bajo condiciones de laboratorio. Se analizan las posibilidades de integración de las plantas biocidas en el control de gorgojos plagas de productos agrícolas almacenados (Iannacone, 2005).

Capítulo II: Generalidades

2.1. Tara

La *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze pertenece a la Familia Caesalpináceae y se conoce comúnmente como tara o taya. Distribuido desde Venezuela, Chile y Bolivia. En el Perú, en los valles interandinos entre 800 y 3000 msnm. Se encuentra en los departamentos de Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Ancash, Apurímac y en la Lomas de la costa central y sur.

Se está cultivando tara orgánica en la provincia de Cañete, en pleno arenal, existiendo alrededor de 200 hectáreas con proyección a 320 hectáreas para el próximo año. Sus frutos, las vainas, tienen amplia aplicación medicinal, la población la usa contra la amigdalitis bajo la forma de gárgaras, contra la fiebre, la gripe, como abortivo, para evitar la caída del cabello, para la tinción de fibras, entre otros usos. La aplicación industrial más importante de las vainas de tara es el de sus taninos en la industria del curtido y en la producción de ácido gálico el cual a su vez es la materia prima para la producción de una gama de otros productos químicos. La goma, contenida en las semillas, tiene gran aplicación en la industria cosmética y alimentaria, al igual que la goma arábica, la goma de tara es un polisacárido tipo galactomanano (Estudio mercado de tara, 2008; Cabello, 2009).

El Perú es el primer productor mundial de tara, para el 2008 se reportó un ingreso de divisa de aproximadamente de 42 millones de dólares por la exportación del polvo de tara. Se indica asimismo que la demanda insatisfecha mundial es del 35,6%, que la demanda crecerá en 21,2% y la oferta en 62%. Se espera que esta oferta sea en función de la explotación de plantaciones y no de bosques naturales o silvestres por lo que debe existir un manejo tecnificado. Debemos incidir que el darle un mayor valor agregado hará de este recurso una fuente más importante de ingreso; llegar a industrializar la tara produciendo el ácido tánico y mejor aún el ácido gálico y a partir de ella los galatos de alquilo u otros “*fine chemicals*” de

uso medicinal incidirá en el desarrollo socio económico de los pobladores involucrados en particular y del país en general.

A la fecha se indica que hay 50 mil familias involucradas en la cadena de valor de la tara. Cuántas más habría si se le da el valor agregado y cuánto más sería el ingreso de divisas si la exportación fuera de ácido gálico u otro producto de mayor valor agregado. Por otro lado, siendo una planta de larga vida útil, con pocas exigencias de suelo, se le considera un cultivo con alto potencial para la reforestación y su producción en zonas marginales (Estudio mercado de tara, 2008; Cabello, 2009).

2.1.1. Descripción botánica de la Tara

La tara se caracteriza por tener un fuste único, pero en otros varios tallos (más de cuatro), rectos y cortos, más o menos cilíndricos y en ocasiones tortuosos.

El tronco está cubierto por una corteza gris y agrietada llena de espinas triangulares, gruesas y cortas en su madurez. Algunas veces, de los troncos nacen ramas desde la base, dando la impresión de poseer varios tallos.

La copa del árbol de tara es generalmente es irregular, de forma aparasolada y poco densa, que puede alcanzar un diámetro de hasta 6,0 m en su madurez, presentan ramas ascendentes. Sus hojas son compuestas bipinnadas, alternas y dispuestas en espiral, cuyos folios (de 6 a 8 pares) dan la forma de plumas con una longitud que varía entre 8 y 12 cm. es una especie caducifolia. Las hojas juveniles son ricos en azucars, lo que le hace propenso para el ataque de insectos chupadores. Su inflorescencia está dispuesta en racimos terminales de 15 a 20 cm de longitud, cuyas flores están ubicadas en la mitad distal. Las flores son hermafroditas, zigomorfas de cáliz irregular, con un sépalo muy largo (1 cm). La corola presenta pétalos de color amarillento o amarillo rojizo.

Los frutos de la tara son vainas indehiscentes de color rojizo amarillo de 8 a 10 cm de largo por 1,5 a 2,5 cm de ancho y contienen de 8 a 10 granos redondeados y ligeramente

aplastados por vaina. Los granos maduros, son duros de color pardo oscuro, brillosos debido a una capa de cera que los cubre y los hace impermeable. El mesocarpio en estado verde es de consistencia blanda, transparente y comestible, con cualidades similares al agar, con contenido de grasas y proteínas con altas cantidades de metionina y triptófano.

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Tracheobionta
Superdivisión	:	Spermatophyta
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Fabales
Familia	:	Fabaceae
Género	:	Caesalpinia
Especie	:	Caesalpinia spinosa
Sinónimos	:	Poinciana spinosa Molina, Caesalpinia pectinata cavanulles, Caesalpinia tinctoria HBK
Nombre científico	:	<i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze
Nombres comunes	:	Tara, Taro, Taya, Guarango, Vinillo, Espino, Changue, Campeche, Cuica, Serrano, Divi divi de tierra fría.
Etimología	:	Caesalpinia, en honor a Andrea Caesalpini (1524- 1603), Botánico y filósofo italiano; spinosa, del latín spinosus-a-um, con espinas (Estudio mercado de tara, 2008; Cabello, 2009).

2.2. Metabolitos Secundarios

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas. Muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales (Avalos, 2009). Ver Figura 1 donde se detalla el origen de algunos metabolitos secundarios como alcaloides, fenilpropanoides y terpenos en el metabolismo primario.

Cabe indicar que se ha desarrollado una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos, basados en la extracción de estos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración. Asimismo, se tiene que el análisis fitoquímico, tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, por ejemplo, plantas medicinales; aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, de separación, purificación y determinación estructural (UV, IR, RMN, EM). Así también, los constituyentes químicos se agrupan según su origen biosintético común, y así podemos mencionar a los terpenos y esteroides, compuestos fenólicos (flavonoides, antocianinas, taninos, etc.), crómenos, benzofuranos, cumarinas, quinonas, alcaloides entre otras (Avalos, 2009).

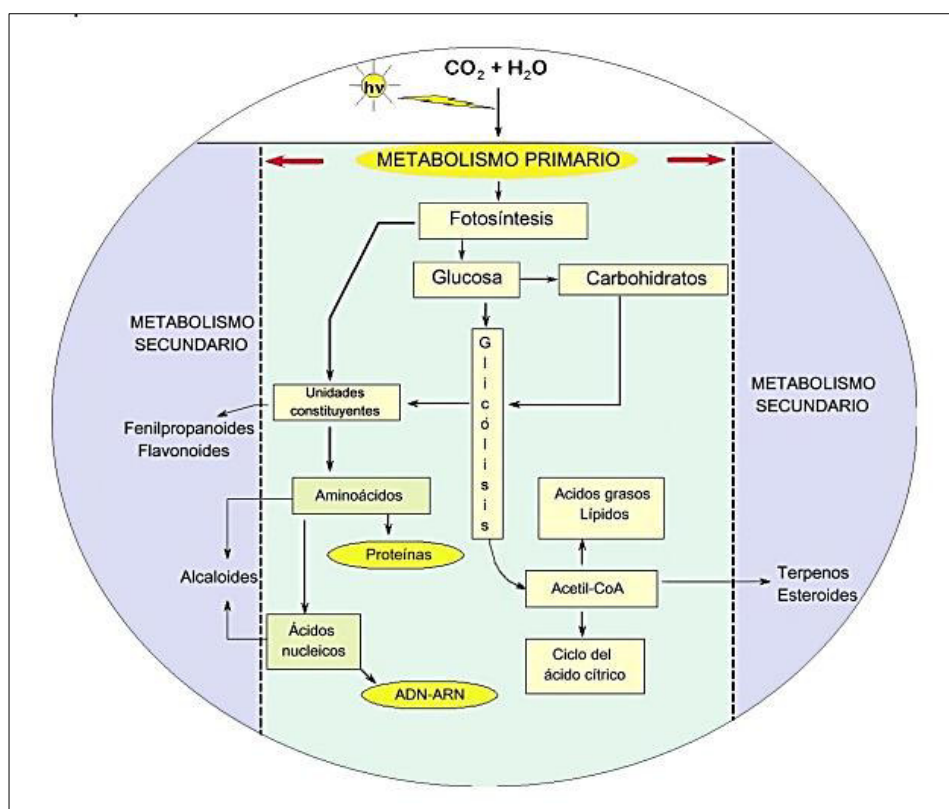


Figura 1. Origen de algunos metabolitos secundarios.

2.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por los vegetales, que presentan en su estructura química anillos aromáticos con grupos hidroxilos responsables

de su actividad antioxidante. Éstos son solubles en agua porque la mayoría de las veces se encuentran unidas a azúcares formando glicósidos y normalmente se localizan en las vacuolas. En general, son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la vía del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, en el caso de los flavonoides). Entre los compuestos fenólicos naturales se encuentran los fenoles monocíclicos, los flavonoides, los fenilpropanoides, las quinonas fenólicas y las cumarinas (ver Figura 2). Las sustancias poliméricas de las plantas como los lignanos y taninos son polifenólicos y ocasionalmente se encuentran unidades fenólicas en las proteínas, alcaloides y terpenoides (Valencia, 2005).

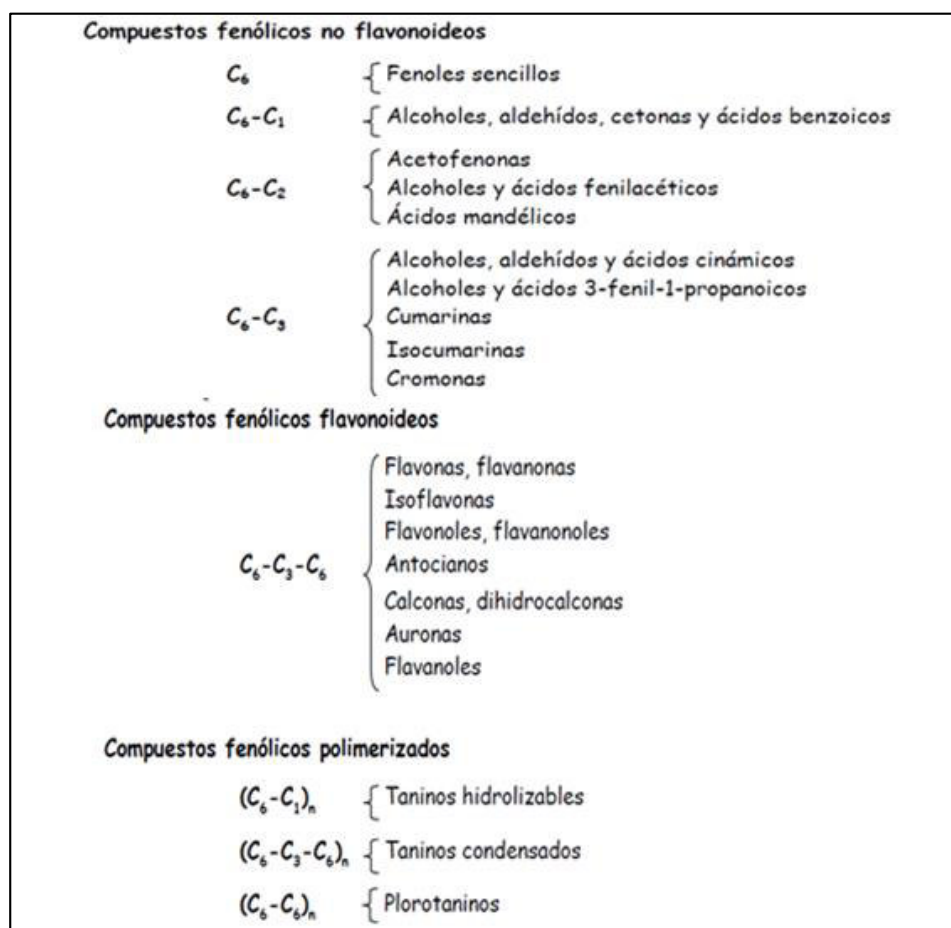


Figura 2. Clasificación de compuestos fenólicos basados en Climent y Esteve (1997).

Recientemente, se ha demostrado que el estrés térmico en las plantas incrementa la producción de compuestos fenólicos como flavonoides y fenilpropanoides. En relación con esto, algunos estudios han reportado un incremento en la actividad de enzimas encargadas de

regular el metabolismo de estos compuestos tales como la polifenoloxidasa (PFO), la peroxidasa (POX) y fenilalanina amino-l iasa (PAL), en respuesta a diferentes tipos de estrés, bióticos y abióticos (Pandolhni, 1992).

2.2.2. Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos, son complejos, de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada, sabor astringente, conocido y empleado desde hace muchos siglos por su propiedad de ser capaces de convertir la piel en cuero. Esto se debe a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas. Precipitan con sales de metales pesados, proteínas y alcaloides. Se trata de compuestos hidrosolubles, dando a veces disoluciones coloidales en agua, solubles también en alcohol y en acetona e insolubles en disolventes orgánicos apolares. Dentro de los vegetales los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides, proteínas u osas (Carretero, 2000).

Clásicamente se han distinguido dos tipos de taninos:

- a) **Taninos hidrolizables.** Llamados también *gálicos* o *pirogálicos*. Estos taninos, como su denominación indica, se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática y son generalmente de formación patológica. Se localizan en algunas dicotiledóneas, especialmente en *Fagaceae*, *Anacardiaceae* y *Leguminosae*. Se encuentran en este grupo los taninos gálicos propiamente dichos, que son polímeros del ácido gálico, ésteres de un poliol, generalmente de la glucosa con varias moléculas de ácido gálico (ver Figura 3) y los taninos elágicos, o elagitaninos también ésteres, pero en este caso del ácido hexahidroxidifénico y sus derivados. El ácido hexahidroxidifénico se forma por acoplamiento oxidativo de dos moléculas de ácido gálico. El ácido sikímico es el precursor biogenético del ácido gálico. Se habla también de los llamados taninos complejos que son elagitaninos más o menos

modificados. Resultan de la unión de un derivado fenilcrománico sobre un éster de glucosa con el ácido hexahidroxidifénico (Carretero, 2000) (ver Figura 4).

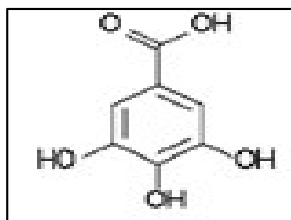


Figura 3. Estructura química del ácido gálico, base de los taninos hidrolizables.

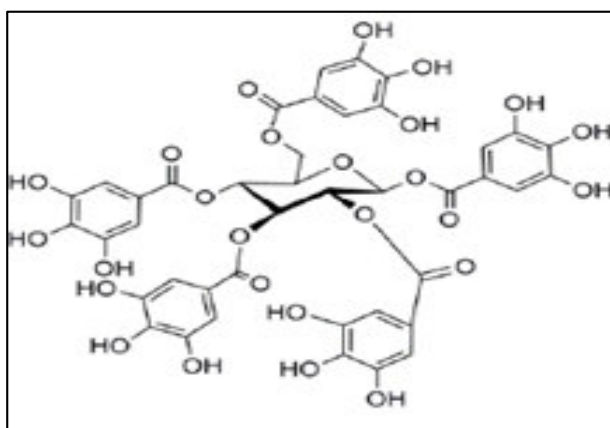


Figura 4. Ejemplo de taninos hidrolizable (pentagaloilglucosa).

b) Taninos condensados o proantocianidinas. Se conocen también como no hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad y, por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (flobáfenos). Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal. Químicamente se forman por condensación de catequinas o catecoles (flavanoles) con uniones directas C-C entre las moléculas, generalmente en 4 -8 o en 4 - 6 y no contienen azúcares en su estructura. Biogenéticamente proceden del metabolismo de los flavonoides, se forman a partir de una flavanona por hidroxilación en el C-3. Para algunos autores existe un tercer tipo de taninos, los florotaninos, que se han aislado de diversas especies de algas pardas y están constituidos por acoplamiento oxidativo únicamente de unidades de floroglucinol C-C y/o C-O. Las propiedades más

interesantes de los taninos se deben a su capacidad de combinarse con diversas sustancias formando complejos. El empleo más antiguo conocido de estas sustancias, como ya se ha comentado, es en la industria de los curtidos. Aunque en la actualidad se utilizan otros compuestos para curtir, todavía en algunos sitios y para curtidos especiales se sigue recurriendo a su uso (Carretero, 2000) (ver Figura 5).

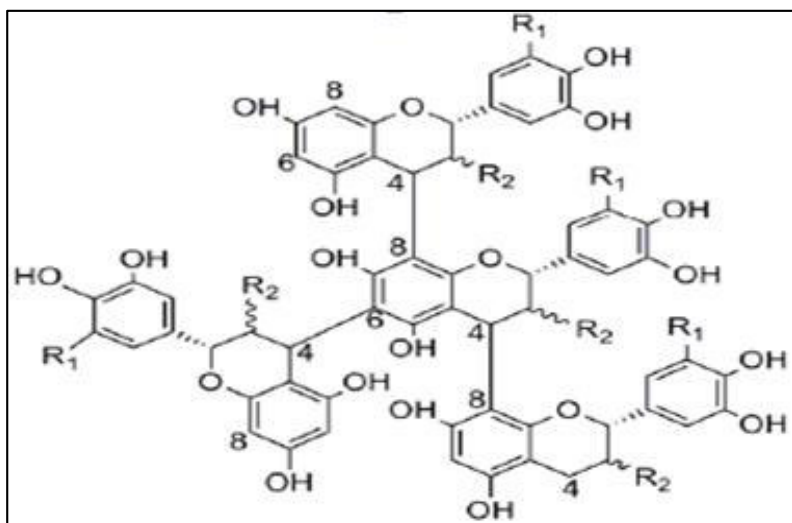


Figura 5. Ejemplo de taninos condensados.

De las actividades farmacológicas de los taninos podemos destacar sus propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica. Por vía interna se emplean como antidiarreicos, favoreciéndose esta actividad por cierto efecto antiséptico, ya que precipitan los enzimas extracelulares secretados por los microorganismos causantes de las infecciones, lo que hace que sean de utilidad en diarreas infecciosas. Poseen también propiedades vasoconstrictoras, por lo que se utilizan tanto interna como tópicamente en el tratamiento de afecciones vasculares como varices o hemorroides y en pequeñas heridas. En uso tópico están indicados en diversos problemas de la piel, empleándose en ciertas dermatosis, así como en cosmética como tónicos astringentes. Presentan también los taninos propiedades antioxidantes, comportándose como captadores de radicales libres (Carretero, 2000).

Asimismo, actúan como inhibidores enzimáticos al precipitar la fracción proteica de los enzimas; esto permite en ocasiones la buena conservación de otros principios activos en

las drogas, como, por ejemplo, algunos heterósidos, ya que impiden su hidrólisis enzimática. También se han utilizado como antídotos en diversos envenenamientos, por ejemplo, con alcaloides tóxicos debido a su propiedad de formar complejos con los mismos. Además de su aplicación en terapéutica los taninos presentan interés industrial: industria de curtidos como ya ha sido comentado, pinturas, adhesivos, etcétera (Carretero, 2000).

2.2.3. Determinación de compuestos fenólicos totales

Método colorimétrico de Folín - Ciocalteau: Todos los métodos hasta ahora publicados que emplean el reactivo de Folín - Ciocalteau (F-C), miden la capacidad que tienen los polifenoles para reducir (donar e^-) y el molibdeno presente en el complejo molibdotungstato que constituye el reactivo de F-C de Mo (VI) a Mo (V). Como resultado de tal reducción, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul, el cual es cuantificado espectrofotométricamente a 765 nm (Warehouse, 2012) (ver Figura 6 y 7).

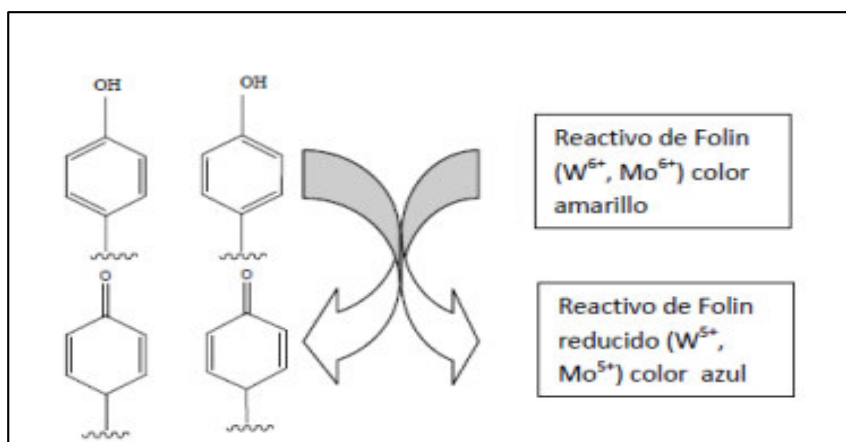


Figura 6. Mecanismo de reacción del reactivo de Folin Ciocalteau.

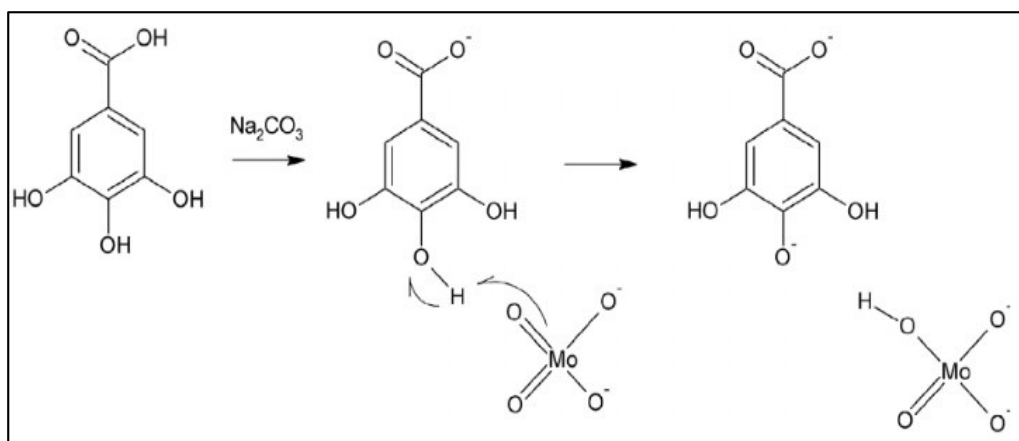


Figura 7. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de *Folin Ciocalteu*.

2.2.4. Determinación de taninos totales

Método tungsto – molíbdico – fosfórico para cuantificar taninos: Este método se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin (tungsto-fosfomolíbdico) en medio básico; el cual produce un complejo de color azul, cuya extinción es medida a 700 nm. Posteriormente se utiliza una solución de gelatina al 25% para garantizar el secuestro de los taninos, obteniéndose de la diferencia de ambas determinaciones el porcentaje de taninos reportados como ácido tánico (Lastra, 2000).

2.3. Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes (AH) actúan generalmente cediendo un electrón o hidrogenión a los radicales libres (R^\bullet) transformándose a su vez en un radical libre de naturaleza no tóxica (A^\bullet), según la ecuación (1), y que en algunos casos puede ser regenerado por la acción de otros antioxidantes. De esta manera, los antioxidantes pueden detener reacciones de propagación e inhibir la oxidación de moléculas evitando la alteración en el funcionamiento normal de la célula (Hallwell, 1995).



Un compuesto es considerado antioxidante cuando cumple al menos una de las siguientes propiedades: (i) eliminar ROS y/u otras especies reactivas; (ii) disminuir la

disponibilidad de especies prooxidantes; (iii) proteger moléculas de la oxidación (Valko, 2007).

2.3.1. Radicales libres

Un radical libre (R^{\bullet}) es una especie química (átomo, ion, o molécula) capaz de existir de forma independiente (de ahí, el termino libre) y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura. Precisamente, debido a la existencia de electrones desapareados, son extremadamente reactivos hasta que consiguen transformarse en una molécula estable a través de una reacción de oxidación-reducción, en la cual el radical gana electrones o hidrogenoides (átomos de hidrógeno) de otra molécula. En general la mayor parte de las reacciones de oxidación son de hidrogenación, es decir, que entrañan la pérdida de átomos de hidrógeno.

Cualquier molécula es susceptible de convertirse en un radical libre tras la ganancia o pérdida de un electrón o tras la ruptura de un enlace homolítico. Un radical puede generar una cascada de reacciones en cadena clasificados como de: (a) **iniciación** (generación de un radical o especie nativa), (b) **propagación** (el número de radicales libres se mantiene constante aumentando el número de productos de la reacción y disminuyendo el de reactivos), y (c) **terminación** (desaparición de los radicales libres por aniquilación o combinación de sus dos electrones desapareados) (Valko, 2007; Rojas, 2010) (ver Tabla 1).

Tabla 1

Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno

	Radicales	No radicalarias
ROS	Anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$)	Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)
	Hidroxilo (OH^{\bullet})	Ácido hipocloroso ($HClO$)
	Alcóxido (RO^{\bullet})	Ozono (O_3)
	Peróxido (ROO^{\bullet})	Oxígeno singlete ($1\Delta O_2$)
	Óxido nítrico (NO^{\bullet})	Anión nitrosilo (NO^-)
RNOS	Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet})	Catión nitrosilo (NO^+)
		Ácido nitroso (HNO_2)
		Alquil peroxinitrito ($ROONO$)

2.3.2. Determinación de la actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. Alternativamente, diversos compuestos cromógenos como ABTS (llamado así por el reactivo 2,2 azinobis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)), DPPH (llamado así por el reactivo 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl), DMPD (dicloridrato de N,N-Dimetilpfeñilendiamina) y FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (EROS). Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (*peroxidase*, mioglobulina), o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical ABTS^{•+} tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Nomura, 1997).

Método de neutralización del radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl):

Este ensayo se basa en la reducción del radical DPPH por los antioxidantes de la muestra. La acción de los antioxidantes puede ser medida por disminución de la señal del radical o por la

disminución de absorbancia a 515 nm que se observa a medida que el radical es reducido por el antioxidante. Se considera un método sencillo y fácil de aplicar, los resultados que se obtienen son altamente reproducibles y comparables con otros métodos. El DPPH es un buen método para medir la capacidad antioxidante en fracciones o alimentos (Nomura, 1997; Molyneux, 2004). Cuando el radical libre acepta un electrón se observa un decremento en su coloración de morado a amarillo, lo cual se interpreta como la capacidad de captura de radicales libres del material ensayado (Molyneux, 2004) (ver Figura 8).

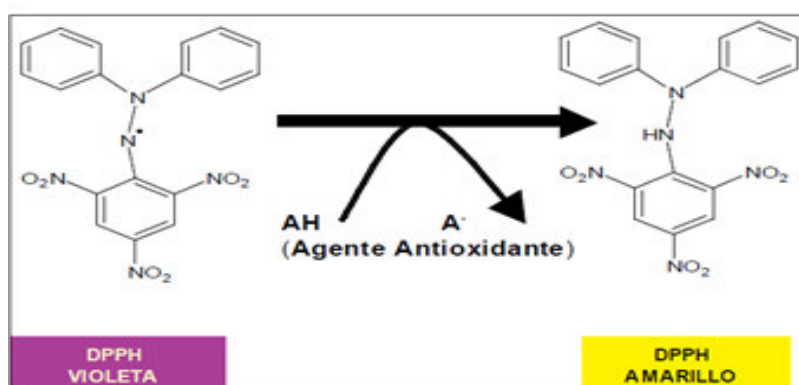


Figura 8. Método del 2,2-difenil-1-1 picrilhidrazilo (DPPH).

2.4. Hidrogeles

La descripción más usual de hidrogeles se refiere a ellos como materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional de origen natural o sintético, que se hinchan en contacto con el agua formando materiales blandos o elásticos, y que retienen una fracción significativa de la misma en su estructura sin disolverse. Los sólidos poliméricos son especialmente aptos para formar geles por su estructura de largas cadenas, la flexibilidad de estas cadenas hace posible que se deforme para permitir la entrada de moléculas de disolvente dentro de su estructura tridimensional (Issa, 2003).

Los geles se pueden clasificar en dos tipos, en función de la naturaleza de las uniones de la red tridimensional que los constituyen. Los geles físicos presentan una red tridimensional formada por uniones que no son completamente estables, las uniones son de tipo *Van der Waals*, mucho más débiles que las uniones covalentes. Los geles químicos son

aquellos en los que la red está formada a través de enlaces covalentes. Este tipo de enlace es muy fuerte y su ruptura conduce a la degradación del gel (Cohn, 2005).

2.4.1. Características de los hidrogeles

Los hidrogeles presentan características particulares como son:

- Carácter hidrófilo: debido a la presencia en la estructura de grupos solubles en agua: debido a la existencia de una red polimérica tridimensional en su estructura.
- Presentan una consistencia suave y elástica la cual está determinada por el monómero hidrófilo de partida y la baja densidad de entrecruzamiento del polímero.
- Se hinchan en agua aumentando considerablemente su volumen hasta alcanzar un equilibrio químico-físico, pero sin perder su forma.

El estado hinchado es el resultado del balance entre las fuerzas dispersivas y las cohesivas intermoleculares que actúan en las cadenas hidratadas. Las fuerzas cohesivas son principalmente debidas a entrecruzamientos covalentes, aunque también contribuyen las fuerzas electrostáticas, hidrófobas, o interacciones dipolo-dipolo (Larez, 2003).

2.4.2. Obtención de hidrogeles mediante radiación gamma

Una de las aplicaciones de las radiaciones ionizantes es la irradiación de monómeros para obtener polímeros y otra es la irradiación de polímeros para obtener sistemas de polímeros entrecruzados, dentro de los cuales, si los polímeros irradiados son acuosos se obtienen los conocidos hidrogeles. Esta manera de obtener hidrogeles es muy apropiada si se desea obtener hidrogeles sin la presencia de sustancias tóxicas, que pueden ser los iniciadores poliméricos o los agentes entrecruzantes, este método es muy apropiado si el uso va a ser para fines biomédicos, ya que después de obtener el hidrogel no se necesita una limpieza ni purificación. Generalmente se usan equipos de irradiación gamma tipo Gamma Cell con fuentes de Co-60 (Yoksan, 2004; Rodas, 2005).

2.4.3. Aplicaciones de los hidrogeles

Los hidrogeles son usados en una gran variedad de aplicaciones tecnológicas, una de ellas es la obtención de hidrogeles inteligentes. Entre las aplicaciones de los hidrogeles tenemos: mantener la humedad de la tierra cultivada, como materiales absorbentes, en membranas, recubrimientos, microcápsulas, en productos para la industria del papel; también para la fijación de herbicidas, en cromatografía, como portadores de enzimas, en el procesamiento de alimentos, en el tratamiento del aire, como rellenos en pieles artificiales, como agentes de separación, entre otros. Las mayores aplicaciones destacan en el campo de la biomedicina en el tratamiento de heridas cancerosas y quemaduras (Yoksan, 2004).

2.4.4. Quitosano

El quitosano es un polisacárido que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de obtención es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente hidróxido de sodio o de potasio a altas temperaturas (ver Figura 9). El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quién encontró que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtenía un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta quitina modificada, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. En 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó *quitosano* (Rodas, 2005).

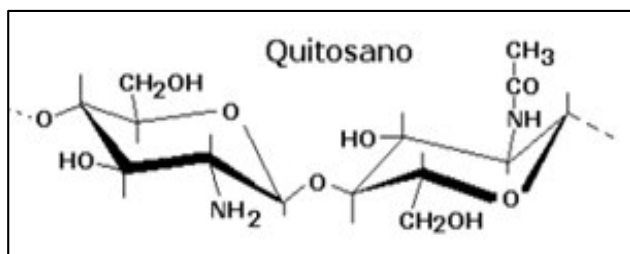


Figura 9. Unidad repetitiva de quitosano.

2.4.5. Alcohol polivinílico (PVA)

Es uno de los polímeros sintéticos más ampliamente usados por sus excelentes propiedades mecánicas. Tiene diferentes tipos de estéreo regularidad (atáctica, isotáctica y

sindiotáctica), sus propiedades fisicoquímicas dependen altamente del método usado para su preparación. El PVA es producido por la polimerización del acetato de polivinilo (PVAc), seguida de una hidrólisis de éste para obtener PVA, la reacción de hidrólisis no resulta siempre completa, resultando un polímero con cierto grado de hidrólisis que depende de la extensión de la reacción. Los grados de hidrólisis y la polimerización

2.5. Técnicas de Caracterización

2.5.1. Espectroscopia FT-IR

Espectro electromagnético. La región infrarroja (del latín, infra, «debajo» del rojo) del espectro corresponde a frecuencias que se encuentran justo por debajo del visible, y por encima de las microondas más altas y de las frecuencias de radar (ver Figura 10).

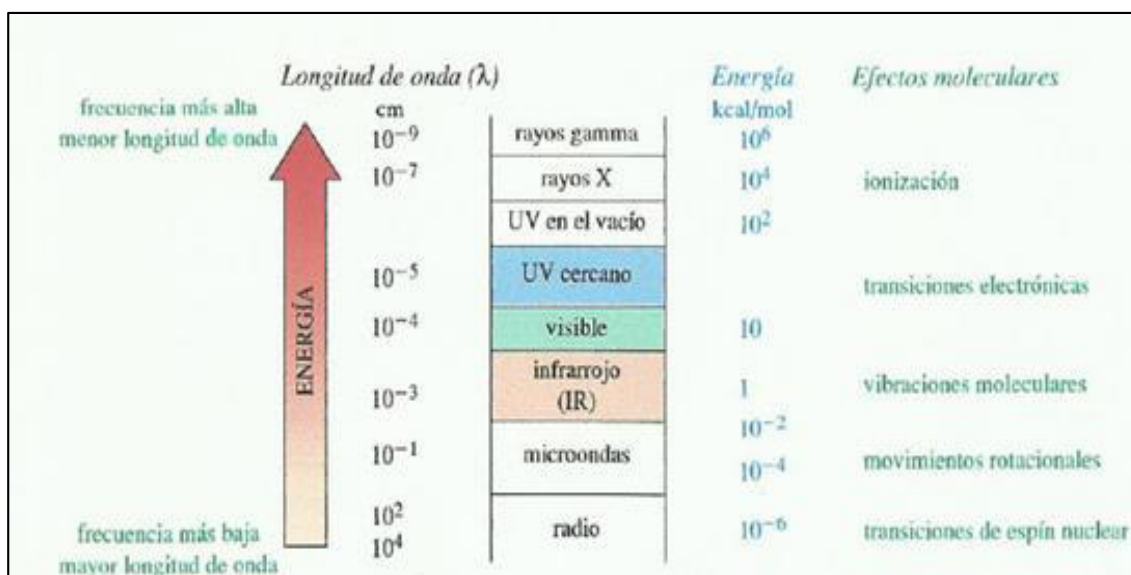


Figura 10. Espectro electromagnético.

El espectro electromagnético es el intervalo de todas las frecuencias posibles, desde cero hasta el infinito. En la práctica, en el espectro se representan desde las bajas frecuencias de radio hasta las altas frecuencias de los rayos gamma.

Las distintas longitudes de onda tienen diferentes energías y las energías tienen distintos efectos moleculares. Los rayos X provocan la ionización de las moléculas debido a su alta energía, mientras que las microondas afectarán al movimiento rotacional de la molécula, Los

rayos infrarrojos provocarán vibraciones moleculares. Cuanto más elevada es la frecuencia, más corta es la longitud de onda.

Vibraciones moleculares. Antes de discutir las absorbancias de infrarrojo características, se debería entender parte de la teoría referida a la energía vibratoria de las moléculas. El siguiente dibujo muestra cómo un enlace covalente entre dos átomos se comporta. Si el enlace se alarga aparece una fuerza restauradora que hace que los dos átomos tiendan a juntarse hasta su longitud de enlace de equilibrio. Si el enlace se comprime, la fuerza restauradora hace que los átomos se separen. Cuando el enlace se alarga o se comprime, y a continuación se deja en libertad, los átomos vibran.

La frecuencia de la vibración depende de las masas de los átomos y de la rigidez del enlace. En un grupo de enlaces con energías de enlaces similares, la frecuencia disminuye al aumentar la masa atómica.

Los enlaces más fuertes generalmente son más rígidos, requiriéndose más fuerza para alargarlos o comprimirlos. Como consecuencia, los enlaces más fuertes generalmente vibran más deprisa que los enlaces más débiles.

Si se consideran los modos de vibración fundamental de una molécula de agua los dos enlaces O—H pueden tensionarse en fase uno respecto a otro (tensión simétrica) o pueden tensionarse sin estar en fase (tensión asimétrica) (ver Figura 11). El ángulo del enlace H—O—H también puede variar, debido a vibraciones de flexión, haciendo un movimiento como el de las tijeras (Douglas, 2000) (ver Figura 12).

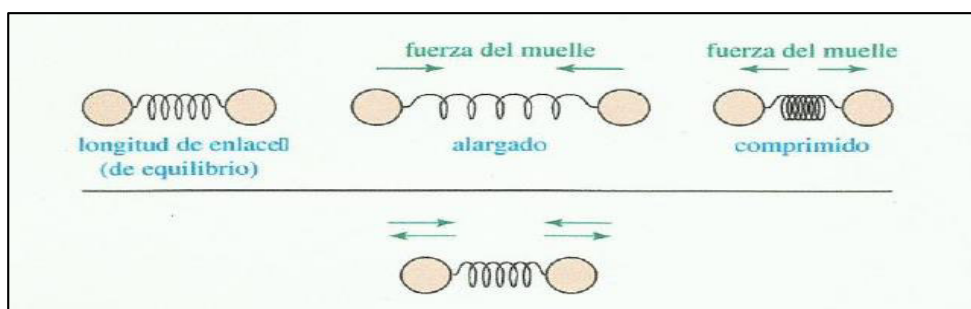


Figura 11. Modelo Vibracional de un Enlace Covalente.

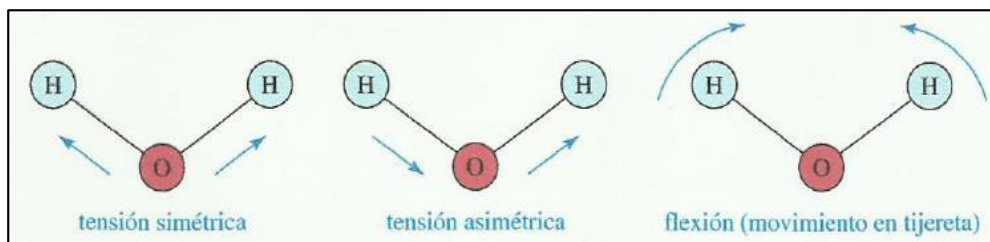


Figura 12. Diferentes tipos de modo de vibración de la molécula del agua.

Es improbable que dos compuestos diferentes (excepto los enantiómeros) tengan las mismas frecuencias de vibración; por este motivo, el espectro de infrarrojo es como si fuera «la huella dactilar» de una molécula. De hecho, a la región del espectro de infrarrojo que contiene la mayoría de las vibraciones (600 a 1400 cm^{-1}) se le conoce como región de la **huella dactilar** del espectro (Douglas, 2000).

Registro del espectro infrarrojo. El espectro de infrarrojo se puede registrar utilizando muestras sólidas, líquidas o gaseosas. Se colocan unas gotas de un líquido en forma de una película delgada, entre dos cristales (en forma de disco o placa) de NaCl o KBr, las cuales son transparentes a las frecuencias más importantes de la luz infrarroja. Los sólidos se pueden analizar después de un tratamiento previo que consiste en triturar y dispersar la sustancia sólida a analizar en KBr (en polvo) hasta conseguir una mezcla homogénea. Una pequeña cantidad de esta mezcla se somete a alta presión (10 TM/cm^2), en un molde y con prensa adecuada, para obtener un disco translúcido que se coloca (en el receptáculo de la muestra del espectrofotómetro) dentro de la fuente de luz. Como alternativa, una muestra sólida se puede triturar y mezclar, de forma homogénea, con aceite de parafina (nujol) para obtener una mezcla pastosa, pero fluida, que se coloca entre dos placas de NaCl cristalino, igual que en el caso de la muestra líquida (Douglas, 2000).

El monocromador utiliza prismas o rejillas de difracción que hacen que sólo entre una frecuencia de luz, cada vez, en el detector; explora y hace un barrido en el intervalo de frecuencias del infrarrojo mientras que una plumilla se mueve a través de las frecuencias correspondientes en el eje X del papel en el registrador (ver Figura 13). La señal del detector

es proporcional a la diferencia de la intensidad de la luz entre los rayos, o haces de referencia compensa cualquier absorción debida al aire o al disolvente. La señal del detector controla el movimiento de la pluma a lo largo del eje Y, con un 100% de transmitancia (sin absorción en la parte superior del papel) y un cero por ciento de transmitancia (absorción de la luz) en la parte inferior (Douglas, 2000).

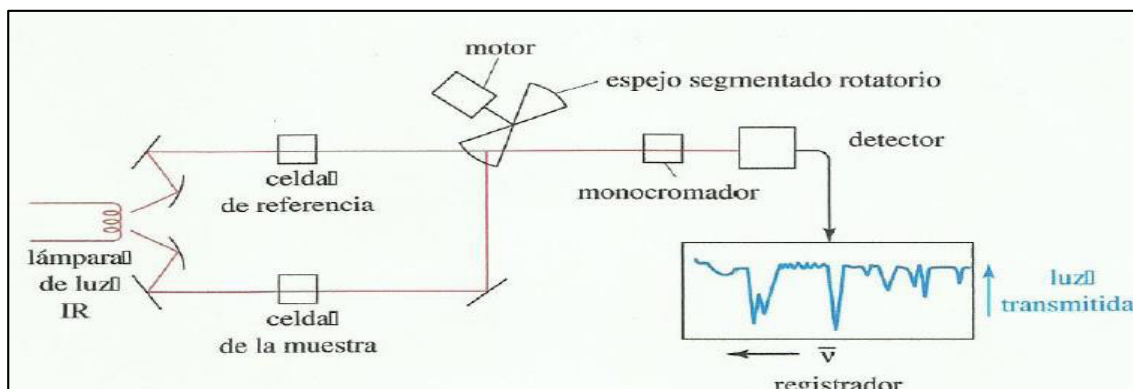


Figura 13. Diagrama de un Espectrofotómetro Infrarrojo.

Un espectrofotómetro de infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR) utiliza un interferómetro para medir un espectro. Un espectrofotómetro FT-IR tiene varias ventajas sobre el instrumento dispersivo: tiene más sensibilidad porque mide todas las frecuencias simultáneamente en lugar de explorarlas individualmente; se necesita una fuente de luz IR de menor energía y menos tiempo (entre 1 y 2 segundos) para la exploración; se pueden completar varias exploraciones en pocos segundos y promediarlas para mejorar la señal; también se mejora la resolución y la precisión, ya que este utiliza una fuente de láser junto a la fuente de IR para controlar la velocidad del espejo móvil y temporizar la población de datos puntuales (Douglas, 2000).

2.5.2. Espectrofotometría UV-Vis

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica que utiliza radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético. Se usa para cuantificar la luz que es absorbida y dispersada por una muestra (una cantidad conocida como extinción, que es definida como la suma de la luz

absorbida y dispersada). Dicho de otra forma, una muestra es colocada entre una fuente de luz y un fotodetector, luego la intensidad de un rayo de luz es medida antes y después de pasar a través de la muestra. Estas medidas son comparadas en un rango de longitudes de onda (λ) para cuantificar la dependencia del espectro de extinción con la longitud de onda. La información generalmente se grafica como extinción en función de la longitud de onda. El fondo o *background* de cada espectro es corregido usando un blanco para evitar que las características espectrales del medio o solvente se incluyan en el espectro de extinción de la muestra. Las bandas del espectro UV son anchas por que incluyen la estructura fina de transiciones vibracionales y rotacionales de menor energía (Douglas, 2000).

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta – visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda comprende entre 190 y 800nm. La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia y éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible, así como en el UV, como es el caso del β -caroteno.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$).

Por aspectos prácticos, se utiliza la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times l \times c$$

Donde: ϵ es el coeficiente de absorptividad molar, l el camino óptico y c la concentración de la especie absorbente). (Douglas A. 2000)

2.5.3. Difracción de Rayos X (DRX)

Es una técnica basada en el fenómeno de difracción de los rayos X por sólidos en estado cristalino, y es utilizada para el estudio y análisis de materiales.

Los rayos X interactúan con los electrones que rodean los átomos por ser su longitud de onda del mismo orden de magnitud que el radio atómico. El haz de rayos X emergente tras esta interacción contiene información sobre la posición y tipo de átomos encontrados en su camino. Los cristales, gracias a su estructura periódica, dispersan elásticamente los haces de rayos X en ciertas direcciones y los amplifican por interferencia constructiva, originando un patrón de difracción. Existen varios tipos de detectores especiales para observar y medir la intensidad y posición de los rayos X difractados, y su análisis posterior por medios matemáticos permite obtener una representación a escala atómica de los átomos y moléculas del material estudiado.

La mayor limitación de este método es la necesidad de trabajar con sistemas cristalinos, por lo que no es aplicable a disoluciones, a sistemas biológicos *in vivo*, a sistemas amorfos o a gases. En algunos casos, los rayos X pueden romper los enlaces químicos que mantienen la integridad estructural, lo que resulta en un modelo distorsionado de la molécula estudiada. Este problema afecta especialmente a los materiales de interés biológico (Gruner, 1998).

Ley de Bragg. La difracción se debe esencialmente a la relación entre las fases de todas las ondas reflejadas por cada celda unidad del cristal. Los rayos que han atravesado distintos puntos del cristal siguen caminos ópticos de diferente longitud y esta diferencia da lugar a un cambio en la amplitud de la onda resultante: Cuando las ondas están completamente desfasadas se anulan entre sí. Por el contrario, cuando las ondas están en fase,

la amplitud de la onda final es la suma de las amplitudes para cada onda. Puesto que un cristal está compuesto de miles de celdas unidad, la interferencia constructiva entre todas ellas resulta en un haz lo suficientemente intenso para poder ser medido con un detector de rayos X (ver Figura 14).

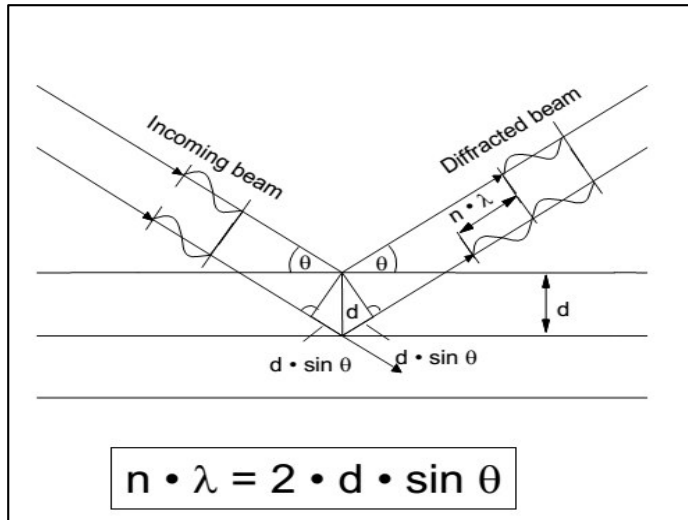


Figura 14. Representación gráfica de la ley de Bragg.

La condición para que las ondas estén en fase es que la diferencia de sus caminos ópticos sea cero o un múltiplo entero n de la longitud de onda. En un cristal, la diferencia en el camino óptico entre átomos situados en posiciones equivalentes en distintas celdas unidad es $2d \sin \theta$, donde d es la distancia entre los planos imaginarios que unen los puntos equivalentes de la red cristalina. Es decir, para que se observe difracción de rayos X a un ángulo de observación 2θ , se debe cumplir la expresión conocida como *Ley de Bragg*:

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Como en el caso de la dispersión elástica por un átomo, la difracción cristalina se puede interpretar como la reflexión especular de los rayos X por todos los planos del cristal paralelos entre sí separados por la distancia d que cumple la ley de Bragg. Por este motivo, los puntos del patrón de difracción se denominan *reflexiones* (Gruner, 1998).

2.6. Actividad Antimicrobiana

El método permite estimar el grado de inhibición de los microorganismos y sus cambios morfológicos de una manera simple. Existen dos métodos posibles para la incorporación del extracto hidroalcohólico: en un disco de papel o en un pocillo hecho en medio de agar (Guiza, 2007).

Método del disco difusión (método de Kirby-Bauer). Esta prueba que permite medir la susceptibilidad in vitro de microorganismos patógenos y fitopatógenos frente a una sustancia o a la mezcla de varias sustancias desconocidas de origen vegetal con potencial antimicrobiano.

Concentración mínima inhibitoria. El antibiograma es la prueba básica de determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos. Un antibiograma es un método estandarizado que permite orientar sobre la selección del antibiótico a utilizar en un enfermo en el que se conozca la bacteria o bacterias causantes de la infección, mediante el establecimiento de una predicción de la respuesta terapéutica (Guiza, 2007).

La determinación de la actividad de los antimicrobianos sobre los microorganismos está, en esencia, basada sobre el concepto de concentración mínima inhibitoria (CMI). La concentración mínima inhibitoria es la concentración más baja de antimicrobiano a la que no se produce crecimiento visible de microorganismos. En teoría, la CMI no sería matemáticamente el valor más adecuado para medir la actividad de un antimicrobiano; Yves Chabbert demostró hace ya dos décadas las ventajas de la CMI 50%; definible como la concentración que es capaz de reducir al 50% el número de colonias que se obtiene en el cultivo control. Solo dificultades prácticas y una mejor sensación de resultados “interpretando clínicamente” han hecho prevalecer el concepto de CMI (Rodríguez, 2007).

2.7. Actividad Cicatrizante

La cicatrización de heridas abiertas es un proceso complejo que requiere de una serie de fases que se encuentran entrelazadas, que depende una de la otra y que no están claramente delimitadas. Luego de que se presenta un rompimiento en la integridad epitelial de la piel que puede estar acompañada de la disrupción de la estructura y función del tejido, se inicia inmediatamente un proceso de reparación que involucra una fase de hemostasis y respuesta inflamatoria, una fase de proliferación y una fase de remodelamiento. En la hemostasis, para muchos autores inmersa dentro de la fase de inflamación, se da la respuesta vascular donde la microvasculatura del tejido alterado permite la extravasación de sangre dentro de la herida e inicia la respuesta para la coagulación y vasoconstricción, el resultado es un coágulo formado por agregación plaquetaria, infiltración de leucocitos con variadas funciones en liberación de antimicrobianos y citoquinas, los cuales son claves en la respuesta inflamatoria (Velandia, 2009).

Capítulo III: Parte Experimental

3.1. Reactivos, Materiales y Equipos

3.1.1. Reactivos

2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo DPPH - Sigma Aldrich, 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio: Folin – Ciocalteu, Metanol grado ACS JT Baker, Etanol grado ACS JT Baker, ácido gálico, carbonato de sodio, ácido tánico, ácido sulfúrico, ácido acético, cloroformo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, formol, agua de bromo, acetato de plomo, alcohol polivinílico (18-88), quitosano, agar Tripticasa Soya, ketamina, amoníaco, hidróxido de potasio, hidróxido de amoníaco, nitrato de bismuto pentahidratado, cloruro de mercurio, yoduro de potasio.

Cepas (*Staphylococcus aureus* (ATCC 15008), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14207).

3.1.2. Materiales

Tubos de ensayo, vasos de precipitado, baguetas, matraces, sistema de reflujo (refrigerante de serpentín), celda de cuarzo, piceta, tubos Ependorf 1,5 mL.

3.1.3. Equipos

Plancha de calentamiento con agitación (IKA), micropipeta, espectrofotómetro FT-IR (SHIMADZU, USAQ), espectrofotómetro UV - visible (Thermo Fisher), difractor de rayos X (Rigaku, IPEN).

3.2. Acondicionamiento de la Materia Prima

3.2.1. Tratamiento de las hojas de tara

Las hojas de tara fueron muestreadas de forma aleatoria de árboles que se encuentran en la Ciudad Universitaria de la UNMSM y caracterizadas por el botánico Carlos Martel.

3.2.2. Obtención del polvo fino

Se procedió a limpiar cada una de las hojas, se pesó y llevó a la estufa a 40°C por 2 días. Se continuó con el triturado en una licuadora convencional, posteriormente se tamizó con mallas ASTM (N° de malla 200, 75 μ) obteniéndose polvo fino de las hojas de tara (ver Apéndice A).

3.2.3. Obtención de extracto de las hojas

Se pesó 2,0 g del polvo fino de tara en 10 mL de diferentes solventes (metanol, etanol, hidroalcohólico (1:1)) se calentó en baño de glicerina a diferentes temperaturas (50°C, 60°C, 70°C, 80°C) durante 2 horas, obteniéndose líquido con muestra ligeramente espesa, que luego se filtró para ser secado utilizando evaporador rotativo (ver Apéndice A).

3.3. Determinación de la Actividad Antioxidante

Se siguió el Método Brand –Williams modificado por Sandoval (Sandoval M. 2000). Se evaluó la capacidad antioxidante del polvo fino de las hojas de tara a diferentes temperaturas con diferentes solventes mencionados. En este método, primero se preparó el radical DPPH (0,0197 g / 50mL etanol 99,9%) se almacenó a 4°C protegiéndolo de la luz. El cual es medido por el espectrofotómetro a 515 nm, en la cual la absorbancia de este debe estar en el rango de 1,0 – 1,5, seguidamente se disuelven los polvos finos en etanol (0,25 g de muestra / 1,25 mL de solución etanol) para luego hacer diluciones sucesivas; y posteriormente se hizo las lecturas con 25 μ L de muestra y 975 μ L de DPPH y todos los extractos fueron medidos por triplicados a diferentes concentraciones de (μ g/mL). Posteriormente, con los valores de absorbancia obtenidas se determinó el porcentaje de captación de radicales libres; y con la ecuación de la recta se determinó los IC₅₀ de cada extracto (ver Apéndice B)

El porcentaje de captación de radicales libres, expresada como porcentaje de inhibición de DPPH, se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% I = [(A_0 - A_f) / A_0] \times 100$$

Donde A_0 y A_f son los valores de absorbancia del blanco (solución de DPPH en alcohol) y la muestra (solución de DPPH más antioxidante disueltos en alcohol), respectivamente. El IC_{50} se calcula graficando el % I en función de la concentración final de la muestra de estudio (ver Apéndice B).

3.4. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales

Se utilizó el método de Folin – Ciocalteau. Se tomaron volúmenes de 0 a 20 μ L de una solución de ácido gálico (0,05 g en 10 mL de EtOH) y diluido en etanol en volumen final a 1 mL. Estas soluciones tendrán una concentración final de 50 – 1000 mg/L de ácido gálico. Se agregó a cada uno de los tubos 3,160 mL agua destilada y 40 μ L de muestra, control o estándar, agitar adecuadamente. Luego añadir 200 μ L del reactivo de Folin - Ciocalteau y se mezcla adecuadamente. Luego de un 1 minuto a temperatura ambiente y añadió 600 L de carbonato de sodio al 20% (p/v) para neutralizar. Luego de 2 horas se agregó 1 mL de muestras, control o estándar en una cubeta y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 765nm (ver Apéndice C).

a) Preparación de la curva de calibración

Se tomaron volúmenes de 0 a 20 μ L de una solución de ácido gálico (0,05 g en 10mL de EtOH) y diluido en etanol en volumen final a 1 mL. Estas soluciones tendrán una concentración final de 50 – 1000 mg/L de ácido gálico.

Agregar a cada uno de los tubos 3,160mL de agua destilada y 40 μ L de muestra, control o estándar, agitar adecuadamente. Luego añadir 200 μ L del reactivo de Folin - Ciocalteau y se mezcla adecuadamente. Espere para entre 30 segundos a 1 minuto a temperatura ambiente y para neutralizar añadir 600 μ L de carbonato de sodio al 20% (p/v) y mezclar nuevamente. Deje las soluciones a temperatura ambiente por 2 horas y para determinar los compuestos fenoles producidos durante la reacción, agregar 1mL de muestras,

control o estándar en una cubeta y leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 765 nm y se representa gráficamente absorbancia vs. Concentración.

b) Preparación de muestras

Se tomó 100 μ L de una solución de extracto (0,025 g de extracto en 2,5 mL de etanol) y se completó con 900 μ L de etanol, para leer en el espectrofotómetro se tomó 40 μ L (Vásquez, 2007).

3.5. Determinación de Taninos Totales

Método tungsto-molibdico-fosfórico para cuantificar taninos (Lastra, 2000). Se preparó el ácido tánico para ser utilizado en la curva patrón; 25 mg de ácido tánico en 100 mL de agua destilada, se cogen 20 mL y se completa volumen hasta 100 mL.

Para la curva patrón se utilizó como referencia el ácido tánico; y las concentraciones de la curva son 1, 3, 6, 9 ppm. En la preparación de la muestra; se utilizó las hojas de tara, se lavó y se pesó en una placa Petri, y se llevó a la estufa a 40 °C para el secado. Se pesaron las hojas secas y se procedió al triturado y tamizado. Se pesó 1 g de polvo de las hojas de tara, en 10 mL de etanol al 50%, se dejó agitando por 6 h, luego se deja en reposo por 8 h, agitar por 30 min, y filtrar. Del filtrado se tomó 3 mL y se llevó a un matraz aforado de 50 mL y se enrasó con agua.

Se preparó el blanco y las muestras por triplicado, para el blanco se agregaron 2 mL de Folín, agua y 1 mL Na_2CO_3 al 20 %, y para la muestra 1 mL del extracto, 2 mL de reactivo de Folín y 1 mL de Na_2CO_3 al 20 %, todos en un matraz volumétrico de 50 mL; y se llevó a leer en un espectrofotómetro a 700 nm (ver Apéndice D).

En la cuantificación de los ***taninos no hidrolizables*** se tomaron 10 mL de extractos, los que fueron mezclados, bajo agitación, con 80 mL de agua, 2,5 g de gelatina y 100 mL de solución saturada de NaCl. Luego de 5 minutos se añadió 5 g de talco, se agitó por 30 minutos, se decantó, se tomó 60 mL del sobre nadante, se filtró y se centrifugó 5 veces. El sólido se

desechó. Se midió 0,5 a 5 mL de la solución anterior, en función del extracto, se agregó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se diluyó con 5 mL de agua. Se dejó reposar 5 minutos y se añadió 1 mL de Na_2CO_3 al 20%, se completó el volumen con agua. Luego de 8 minutos de reposo se leyó la absorbancia a 700 nm.

Los taninos hidrolizables se obtuvieron por diferencia entre taninos totales y los taninos no hidrolizables.

3.6. Screening Fitoquímico

La determinación cualitativa de los metabolitos secundarios se realizó según el procedimiento estándar referido. En el *screening fitoquímico*, se procedió con el análisis cualitativo. Se comprueba la gran diversidad de metabolitos secundarios con respuestas positivas (Lock, 1994; Domínguez, 1973; Gibaja, 1985; Gibaja, 1996).

3.6.1. Saponinas

- (i) **Prueba de la espuma.** A una solución acuosa de las hojas de tara, se somete a una agitación vigorosa durante 30 segundos. La presencia de la saponina es indicada por la formación de una espuma persistente durante 3 minutos, resultado positivo (ver Apéndice E).
- (ii) **Reactivo de Salkowski.** A 2 mg de las hojas de tara se añade 1 mL de H_2SO_4 cc, luego 5 gotas de anhídrido acético Ac_2O . Se observa coloraciones de amarillo a rojo sangre. En las hojas de tara no dio las coloraciones mencionadas (ver Apéndice E).
- (iii) **Variante A de Reacción Salkowski.** A la muestra disuelta en cloroformo y anhídrido acético refrigerado y una gota de H_2SO_4 cc por las paredes del tubo. Se observa coloración rojo-grosella para saponinas triterpénicas y coloración azul-verdosa para saponinas esteroidales. En las hojas de tara resultado negativo (ver Apéndice E).
- (iv) **Variante B Reacción Salkowski.** A la muestra se disuelve con cloroformo y se añade 1 mL de H_2SO_4 cc. Si da color amarillo o rojo, se considera reacción positiva, si es

rojo azulado hasta púrpura se le considera saponinas esteroideas, si es rojo colesterol.

En las hojas de tara resultado negativo (ver Apéndice E).

- (v) **Reactivo de Libermann Burchard.** A una pequeña cantidad de la muestra se añaden unas pocas gotas de AcOH y 3 mL de AC_2O / H_2SO_4 cc (50: 1). En el que las saponinas triterpenoidales dan color rosado a púrpura mientras las esteroideas dan azul-verdoso. En las muestras de las hojas de tara dio resultado negativo (ver Apéndice E).

3.6.2. Flavonoides

Preparación de la muestra. Se deja las hojas de tara en maceración con etanol durante una hora (solución etanólica).

- (i) **Reactivo de Shinoda.** En un tubo de ensayo se coloca 1 mL con 2 limaduras de magnesio, con un gotero se añaden 3 gotas de HCl concentrado. Se observa un intenso burbujeo por la reacción de las limaduras y la solución adquiere una débil coloración naranja al principio, conforme va reaccionando más, la coloración naranja se va intensificando, hasta que después de 10 minutos la solución tiene un color anaranjado intenso. Lo que indica un resultado positivo (ver Apéndice E).
- (ii) **Reacción de cloruro férrico.** A 1 mL de la muestra se agregan 3 gotas del reactivo, instantáneamente la solución toma un color verde oscuro casi negro, lo que indicaría la presencia de compuestos fenólico y taninos (ver Apéndice E).

3.6.3. Taninos

- (i) **Reacción con gelatina-cloruro de sodio.** A 1 mL de muestra, se agregar 3 gotas de gelatina - cloruro de sodio. Se observa la formación de un precipitado, resultado positivo (ver Apéndice E).
- (ii) **Reacción con FeCl_3 .** Si un extracto acuoso tánico se mezcla con cloruro férrico o alumbre férrico y da una coloración negra azulada, el tanino pertenece a los derivados

del ácido pirogálico y si es verde deriva de la catequina. En las hojas de tara dio resultado positivo (ver Apéndice E).

(iii) Reacción de pp. con agua de bromo. La precipitación con el agua de bromo indica la presencia de un tanino catéquico o flobatino. En las hojas de tara se observa un precipitado (ver Apéndice E).

(iv) Reacción formaldehído. Si una solución de un tanino se trata con formol y gotas de ácido clorhídrico y se calienta ligeramente; se precipita totalmente el tanino de la clase catéquica. Los taninos pirogálicos en las mismas condiciones dan compuestos parcialmente solubles. Se observa reacción positiva indicándola presencia de taninos pirogálico (ver Apéndice E).

(v) Reacción acetato de plomo. Todos los taninos naturales precipitan completamente con el acetato de plomo en solución neutra, de modo que el filtrado no de reacción con una sal férrica. En el caso de los taninos catéquicos, este precipitado se disuelve en ácido acético diluido mientras que el precipitado de los galotaninos es total o parcialmente insoluble. De este modo los taninos catéquicos no dan precipitado (Dominguez, 1973) (ver Apéndice E).

3.7. Preparación de Hidrogeles

Para la preparación de los hidrogeles, se utilizó alcohol polivinílico (18-88) y quitosano; 36 g de PVA / 360 mL H₂O se calentó 80°C se agregó dé a pocos para que no se forme grumos, se sigue calentando y constante agitación hasta su disolución y se dejó enfriar para que las burbujas desaparezcan. En el caso del quitosano y 2,4 g de quitosano / 240 mL ácido acético (1%), se disolvió a temperatura ambiente con agitación constante por una hora. Las dos soluciones se mezclaron en la proporción de 4:6 y se irradiaron con radiación gamma a 15 kGy; luego de evaporar los líquidos, las películas se enjuagaron con agua destilada y se procedió a llevar a la estufa a 40 °C.

La fracción de tara que se utilizó en el estudio de cicatrización fue el extracto etanólico del polvo fino obtenido de las hojas de tara (*Caesalpinia spinosa*). Este extracto seco fue resuspendido en una solución hidroalcohólica (10%), la que fue filtrada y centrifugada. Finalmente, las películas de quitosano - PVA 1,5 x 1,5 cm fueron sumergidas en estas soluciones por 10 minutos, luego envasadas en bolsas de polietileno y selladas al vacío. Estas películas fueron preparadas un día antes del inicio de los experimentos (Carhuapoma, 2005).

3.8. Espectroscopia FT IR

Se usó el método ATR (attenuated total reflection); se mezcló KBr con las muestras en una relación de 3:7, respectivamente, se homogenizó en un mortero de ágata, después se coloca en el recipiente de muestras del accesorio de reflectancia difusa; finalmente primero se lee el blanco con un espejo del accesorio y luego las muestras. (Guía para análisis de muestra para Infrarrojo).

3.9. Difracción de Rayos X en Polvo

Los extractos, en forma de polvo fino, fueron depositados en el portamuestra del difractómetro de rayos X (Brucker). Se hizo un barrido entre 5 a 80 °.

3.10. Actividad Antimicrobiana

(i) **Preparación de la muestra.** Se preparó una solución stock con 0,25 g de extracto seco de hojas de tara, el que fue resuspendido en 1 mL de DMSO 5% y posteriormente fue esterilizado con filtro de membrana de 0,45 µm. Las soluciones fueron mantenidas en refrigeración y previamente agitadas hasta antes de la realización de la prueba (ver Apéndice F).

(ii) **Microorganismos de prueba.** Para la evaluación de actividad antimicrobiana se emplearon los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25922,

Escherichia coli ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Las cepas fueron mantenidas en caldo Tripticasa de Soya a 37°C (ver Apéndice F).

(iii) **Prueba de antibiosis (método de pocillos).** La prueba de antibiosis fue realizada en Agar Tripticasa Soya. El inóculo fue preparado usando cultivos de 18 horas de los microorganismos de prueba a 0,5 escala de McFarland. Cada suspensión bacteriana fue inoculada en un volumen de 35 µL a un tubo con 4mL de TSB semisólido, luego se homogenizó y vertió sobre la totalidad de la superficie del agar. Seguidamente se realizaron los pocillos y se vertió 35 µL de cada solución respectivamente. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Se usó Estreptomicina (10 µg) y Ciprofloxacina (5 µg), como controles positivos (León, 2011) (ver Apéndice F).

3.11. Concentración Mínima Inhibitoria

(i) **Preparación de la muestra.** Se preparó una solución stock con 0,25 g de extracto seco de hojas de tara, el que fue resuspendido en 1 mL de DMSO 5% y posteriormente fue esterilizado con filtro de membrana de 0,45 µm. Las soluciones fueron mantenidas en refrigeración y previamente agitadas hasta antes de la realización de la prueba.

(ii) **Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria.** Para esta prueba se empleó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, la cual fue mantenida en caldo agar tripticasa Soya a 37°C de incubación. Se realizó siguiendo la metodología de pocillos en placas de microdilución. Se prepararon diversas diluciones de los extractos de hojas a las concentraciones de 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL y 3,13 µg/mL. Se colocó en pocillos muestras (10 µL) de cada dilución, a los que se le adicionó 80 µL de caldo tripticasa soya a doble concentración; luego de ser mezclados se agregó 10 µL de la suspensión bacteriana (0,5 escala de Mc Farland). El material se incubó a 37 °C durante 24 horas. Trascurrido el tiempo se vertió 40 µL de una solución de cloruro de trifetil tetrazolio (TTC) en cada pocillo, para luego incubarlo a 37 °C por 30 minutos

adicionales. El viraje del medio a rojo indicó crecimiento microbiano. Se usó Eritromicina 100 µg/mL como controles de inhibición (León, 2011).

3.12. Evaluación *in vivo* de la Cicatrización de Heridas Provocadas por Quemadura

Se utilizaron seis conejas de tres meses de edad, a quienes se les depiló el lomo, se les aplicó anestesia general (10 mg/Kg de ketamina) y lidocaína como anestésico local antes de provocarles una quemadura con una superficie de aluminio de 1,5 x 1,5 cm a 110°C durante 15 segundos. Cada coneja tuvo cuatro quemaduras (1-4):

- Quemadura 1: Tratada con una película de Quitosano-PVA (PVA-Q), + extracto etanólico de hoja de tara
- Quemadura 2: Tratada con una película PVA-Q, + solución hidroalcohólica
- Quemadura 3: Tratada con furacina como control
- Quemadura 4: Tratada con solución de extracto solo de las hojas de tara
- Quemadura 5: Sin tratamiento

A los 7, 14 y 21 días se hicieron las evaluaciones macroscópicas que consistieron en tomar las medidas de las heridas, observar sus características morfológicas y hacer las biopsias para el posterior estudio histológico (ver Apéndice G). Para determinar el efecto en la cicatrización de las quemaduras por el tratamiento se analizó el área y el porcentaje de retracción la retracción de las quemaduras que fue obtenido con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de retracción de la quemadura} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

Donde A_0 es el área de la quemadura original, y A_t es el área de la herida en el momento de la biopsia (Rojas, 2011).

Capítulo IV: Resultados y Discusión de Resultados

4.1. Obtención del Extracto de las Hojas de Tara

Se utilizó metanol, etanol y una solución hidroalcohólica para extraer los metabolitos de las hojas de la tara. La Tabla 2 resume los resultados obtenidos, donde para el metanol se obtuvieron rendimientos que oscilaban entre 15 y 31%, este rendimiento incrementó con la temperatura. Caso similar ocurrió para el etanol. Con la solución hidroalcohólica los rendimientos fueron menores por el efecto del agua.

Tabla 2

Rendimiento Porcentual de los Extractos de las Hojas de Tara a Diferentes Temperaturas

Muestra	Solventes	Temperatura °C	Peso material vegetal seco (g)	Peso del extracto seco (g)	Rendimiento (%)
Hojas frescas	Metanol	50	2	0.316	15,6
		60	2	0.360	18,10
		70	2	0.53	26,7
		80	2	0.628	31,41
	Etanol	50	2	0.324	16,21
		60	2	0.332	16,62
		70	2	0.348	17,4
		80	2	0.487	24,35
	Hidroalcohólico	50	2	0.263	13,14
		60	2	0.284	14,21
		70	2	0.329	16,44
		80	2	0.344	17,22

4.2. Determinación de la Actividad Antioxidante

La técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH. Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.

Esta medición permite observar una primera fase muy rápida, seguida ulteriormente por una reacción lenta, lo que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a reacciones de los productos de ésta.

Los resultados experimentales se expresan como el valor IC_{50} , es decir la concentración de la muestra problema que produce una inhibición del 50% del radical libre DPPH (Guija, 2015).

La variación de la capacidad de captura del radical DPPH se da en función de la concentración del extracto de las hojas de tara; y se sabe que bajos valores de IC_{50} reflejan alta actividad para inhibir los radicales libres.

En el Tabla 3, podemos observar los resultados de actividad antioxidante del extracto etanólico de tara obtenido a diferentes temperaturas. Se observa que cuando la extracción se realizó a 80 °C y 50 °C, se obtienen los valores más bajos. Esto indica que tiene mejor capacidad antioxidante y además están cercanos al patrón de comparación (ácido ascórbico).

Tabla 3

Extracto de Hojas Tara: Actividad Antioxidante a Diferentes Temperaturas en Etanol

Temperatura °C	% Inhibición				IC_{50} (µg/mL)
	15	5	1.6	0.5	
50	88.608 ± 0.067	39.514 ± 0.43	16.977 ± 0.04	11.367 ± 0.04	6.496 ± 0.02
60	91.756 ± 0.04	40.099 ± 0.40	18.321 ± 0.03	9.214 ± 0.03	6.600 ± 0.02
70	88.622 ± 0.04	37.98 ± 0.00	18.345 ± 0.39	8.772 ± 0.03	6.612 ± 0.00
80	90.092 ± 0.03	40.945 ± 0.37	19.215 ± 0.04	12.845 ± 0.03	6.325 ± 0.02

Datos expresados en media ± SD, n = 10, p < 0,05.

El IC_{50} del ácido ascórbico fue de 2,71 µg/mL

En la Tabla 4, podemos observar los resultados, en el cual el metanol a 50°C, seguido de metanol a 70 °C, tiene los valores más bajos, esto indica que tienen mejor actividad antioxidante.

Tabla 4

Extracto de Hojas Tara: Actividad Antioxidante a Diferentes Temperaturas en Metanol

Temperatura (°C)	% Inhibición				IC_{50} (µg/mL)
	45	15	5	1.6	
50	92.205 ± 0.33	41.715 ± 0.04	20.912 ± 0.04	11.216 ± 0.04	19.162 ± 0.01
60	92.952 ± 0.05	41.624 ± 0.02	21.054 ± 0.03	10.452 ± 0.07	19.326 ± 0.02
70	93.782 ± 0.04	41.59 ± 0.04	16.92 ± 0.04	7.205 ± 0.03	20.224 ± 0.03
80	93.598 ± 0.04	33.693 ± 0.03	13.432 ± 0.04	8.058 ± 0.04	21.482 ± 0.00

Datos expresados en media ± SD, n = 10, p < 0,05.

En la Tabla 5, podemos observar los resultados, en el cual el metanol a 50°C, seguido de metanol a 70 °C, tienen los valores más bajos, esto indica que tienen mejor actividad antioxidante.

Tabla 5

Extracto de Hojas Tara: Actividad Antioxidante a Diferentes Temperaturas en Hidroalcohólico

Temperatura °C	% Inhibición				IC ₅₀ µg/mL
	1215	405	135	45	
50	92.505 ± 0.03	47.595 ± 0.03	29.625 ± 0.03	20.085 ± 0.03	430.055 ± 0.32
60	95.078 ± 0.03	40.04 ± 0.22	25.221 ± 0.03	16.136 ± 0.03	501.954 ± 1.46
70	94.816 ± 0.04	43.87 ± 0.36	29.758 ± 0.03	20.715 ± 0.03	451.952 ± 1.73
80	93.756 ± 0.05	42.891 ± 0.26	29.681 ± 0.02	20.648 ± 0.02	452.450 ± 1.06

Datos expresados en media ± SD, n = 10, p < 0,05.

4.3. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales Folin-Ciocalteu

El método más utilizado para la determinación de polifenoles totales es el ensayo de Folin-Ciocalteu. Este se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu corresponde a una mezcla de ácidos fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), que en presencia de fenoles se reduce a óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). El color es proporcional al número de grupos hidroxilos (Fernández, 2008).

En la Tabla 6 y Figura 15 se muestran los resultados de la curva estándar de ácido gálico a diferentes concentraciones en donde se obtuvo una $R^2 = 0,9993$ usando estándares de ácido gálico (0-500 mg/L). El contenido de polifenoles totales se determinó como los equivalentes de ácido gálico (EAG, mg de ácido gálico/g de muestra) y los valores se presentan como la media de los datos del análisis llevado a cabo por triplicado.

Los resultados obtenidos en la determinación de polifenoles totales demostraron que en el extracto metanólico a 80°C de las hojas de tara tiene mayor cantidad de polifenoles 476,266 mg de EAG/1 g de muestra (Tabla 7), seguido por el extracto

etanólico a 80°C 457,36 mg de EAG/1 g de muestra (Tabla 8), y por último el extracto hidroalcohólico a 90°C 424,266 EAG/1 g de muestra (Tabla 9).

Tabla 6

Concentración y Absorbancia para la Curva de Ácido Gálico - Método Folin-Ciocalteu

Concentración (mg/L)	Absorbancia
0	0
50	0.058
100	0.11
150	0.17
250	0.281
500	0.536

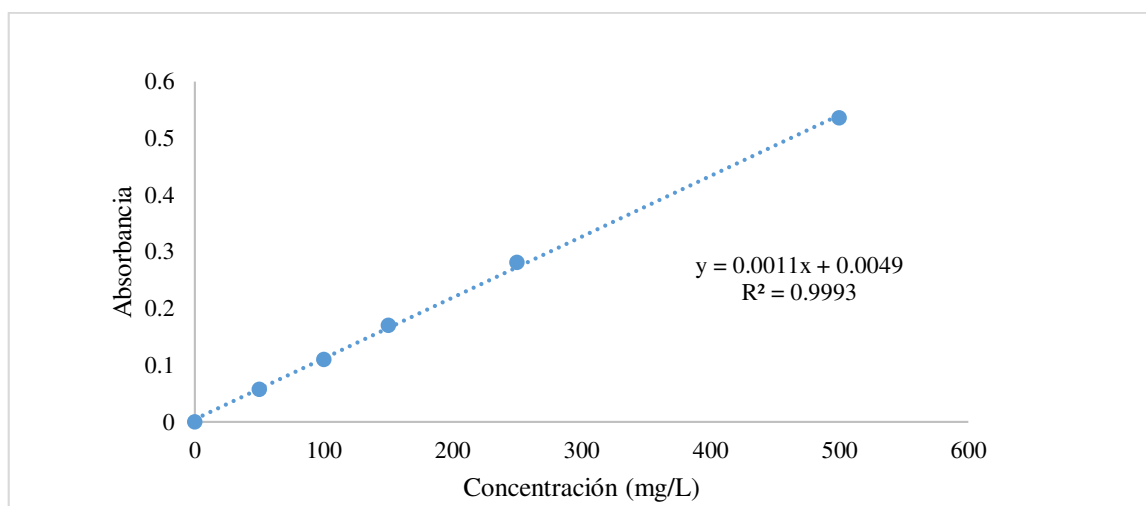


Figura 15. Curva estándar de ácido gálico.

Tabla 7

Extracto de Hojas de Tara: Polifenoles a Diferentes Temperaturas en Etanol

Temperatura (°C)	mg EAG/1g de muestra
	Etanol
50	219.722 ± 1.874
60	338.634 ± 0.470
70	385.176 ± 0.470
80	457.360 ± 0.000

Tabla 8

Extracto de Hojas de Tara: Polifenoles a Diferentes Temperaturas en Metanol

Temperatura (°C)	mg EAG/1g de muestra
	Metanol
50	411.176 ± 0.940
60	408.73 ± 0.431
70	419.362 ± 0.940
80	476.45 ± 0.960

Tabla 9

Extracto de Hojas de Tara: Polifenoles a Diferentes Temperaturas - Hidroalcohólico

Temperatura (°C)	mg EAG/1g de muestra Hidroalcohólico
50	386.996 ± 0.470
60	389.635 ± 0.480
70	395.995 ± 0.480
80	409.55 ± 0.293

4.4. Determinación de Taninos Totales

La curva de calibración del ácido tánico (Tabla 10 y Figura 16), en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación $Y = 0.0353X + 0.0059$, y a un coeficiente de correlación igual a 0,9999. Los taninos están compuestos principalmente por polifenoles además de otros compuestos presentes en menor proporción. El porcentaje de grupos fenólicos reactivos presentes en los extractos de las hojas de tara no se puede deducir directamente del porcentaje de no taninos.

Tabla 10

Concentración y Absorbancia para la Curva Estándar de Ácido Tánicos

Concentración (ppm)	Absorbancia
1	0.042
3	0.11
6	0.219
9	0.323

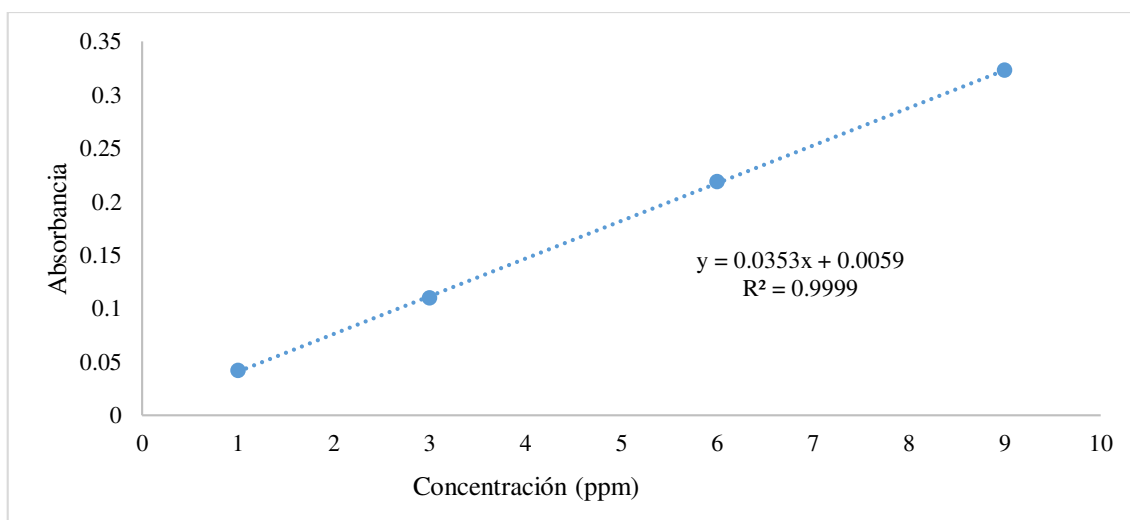


Figura 16. Curva estándar de ácido tánico.

Los extractos metanólico 50°C, obtenidos de las hojas de tara son los que presentan el mayor contenido de taninos totales (18 %) y taninos hidrolizables (16 %), Tabla 11. En cambio, los extractos hidroalcohólicos son los que presentan un contenido de taninos no hidrolizables más bajo (1,94 %). Esto contrasta con los resultados obtenidos para la vaina de la tara, en el que se determinó que los extractos hidroalcohólicos y metanólicos son los que presentan el mayor contenido de taninos totales (Avilés, 2010).

Tabla 11

Contenido de Taninos de los Extractos de Hojas de Tara

Extractos	%Taninos Totales	%Taninos Hidrolizables	%Taninos No Hidrolizables
Metanol 50°C	18.024 ± 0.03	16.207 ± 0.04	1.817 ± 0.03
Metanol 60°C	17.514 ± 0.02	15.390 ± 0.04	2.124 ± 0.03
Metanol 70°C	16.404 ± 0.10	14.098 ± 0.03	2.306 ± 0.03
Metanol 80°C	16.185 ± 0.02	12.165 ± 0.04	4.02 ± 0.04
Etanol 50°C	15.572 ± 0.04	13.504 ± 0.05	2.068 ± 0.03
Etanol 60°C	16.456 ± 0.04	13.994 ± 0.05	2.462 ± 0.03
Etanol 70°C	15.995 ± 0.02	13.269 ± 0.05	2.726 ± 0.04
Etanol 80°C	16.305 ± 0.02	13.579 ± 0.04	2.726 ± 0.03
Hidroalcohólico 50°C	17.63 ± 0.02	14.842 ± 0.05	2.788 ± 0.04
Hidroalcohólico 60°C	17.38 ± 0.01	14.799 ± 0.04	2.581 ± 0.04
Hidroalcohólico 70°C	16.668 ± 0.01	13.798 ± 0.04	2.87 ± 0.03
Hidroalcohólico 80°C	17.508 ± 0.02	14.751 ± 0.04	2.757 ± 0.04

Datos expresados en media ± SD, n = 10, p < 0,05.

4.5. Screening Fitoquímico

El screening fitoquímico es muy importante porque nos permite determinar de forma cualitativa aquellos metabolitos secundarios presentes en las muestras. En la Tabla 12 se evidencia la presencia de saponinas, flavonoides y taninos en todos los extractos a diferentes temperaturas de las hojas de tara.

La presencia de saponinas se evidencia por las pruebas positivas de la espuma y de *Salkowski*. La variante de la prueba de *Salkowski* no fue muy concluyente, especialmente para los extractos hidroalcohólicos, en cambio la prueba de Liebermann-Burchard fue negativa. En esa línea, la presencia de flavonoides se evidencia por las tres pruebas ensayadas (*Shinoda*, NaOH, FeCl₃), todas positivas. La presencia de taninos fue

evidente en todas las muestras analizadas. Se observó una coloración verde negruzca, lo cual indica la presencia de taninos de tipo pirogálico. También se obtuvo resultado positivo debido a la presencia de precipitado en el ensayo de la gelatina. La presencia de taninos en estos extractos era de esperarse ya que son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos entre las plantas, cuya función es ejercer un efecto inhibitor sobre muchas enzimas por la precipitación de proteínas, por lo que contribuyen a la función protectora en corteza y leños. Pueden encontrarse en todos los órganos y se pueden acumular en tejidos viejos o tejidos patológicos (agallas) (López, 2007). En cambio, las pruebas cualitativas indican la ausencia de antocianinas, cumarinas, quinonas y alcaloides. Todas las pruebas cualitativas dieron resultado negativo.

4.6. FT-IR

De manera general, el análisis de los espectros infrarrojo (FT-IR) de todos los extractos muestran una amplia banda intensa y fuerte alrededor de $3400-3600\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al estiramiento del grupo OH, el ensanchamiento es mayor con respecto una banda típica de OH y es atribuido a un mayor número de iones hidroxilo presentes al ser la tara rica en polifenoles. Otras señales a 1637 cm^{-1} es producto del alargamiento de los dobles enlaces carbono-carbono de las estructuras aromáticas presentes en este tipo de metabolitos. El pico a 1541 y 1452 cm^{-1} son producto del estiramiento de C-C enlace del anillo aromático. Se observa un pico agudo a 1205 cm^{-1} corresponde al enlace C-O de fenoles y el pico próximo a 1033 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace C –O. Debido a que los taninos presentes en la tara se hidrolizan por acción de ácidos o enzimas originando un azúcar, un polialcohol y un ácido fenol carboxílico y a su vez la naturaleza

Tabla 12

Resultado de Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de Hoja de Tara

COMPONENTE QUIMICO	REACCION DE IDENTIFICACIÓN	METANOL 50 ° C	METANOL 60 ° C	METANOL 70 ° C	METANOL 80 ° C	ETANOL 50 ° C	ETANOL 60 ° C	ETANOL 70 ° C	ETANOL 80 ° C	HIDROALCOHOLICO 50 ° C	HIDROALCOHOLICO 60 ° C	HIDROALCOHOLICO 70 ° C	HIDROALCOHOLICO 80 ° C
SAPONINAS	Prueba de la espuma	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Reactivo de <i>Salkowsky</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Variante de reacción de <i>Salkowsky</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Reactivo de <i>Liebermann Buchard</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
FLAVONOIDES	Reactivo de <i>Shinoda</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Reacción con NaOH 20%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Reacción con FeCl ₃	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
TANINOS	Reacción con Gelatina NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Reacción de precipitación con agua de bromo	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Reacción con formaldehído	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Reacción con Acetato de plomo Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Reacción con FeCl ₃	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(--) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia

De este último ácido puede proveer presencia de galotaninos y elagitaninos, por ello debajo se muestra un contraste del espectro obtenido con el del galotanino de una librería, los espectros se parecen en un 90%, sin embargo, para el espectro obtenido observamos una fuerte disminución del pico a 1710 cm^{-1} aprox. que corresponde al estiramiento del grupo carbonilo de los productos con grupo éster.

En el espectro infrarrojo medio entre $4000 - 1300\text{ cm}^{-1}$ (región de frecuencias). Se observa una serie de bandas asignadas a vibraciones de solo dos átomos de moléculas. En este caso la banda de absorción se asocia únicamente a un grupo funcional y a la estructura molecular completa, aunque hay influencias estructurales que provocan desplazamientos significativos en la frecuencia de la vibración. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrogeno (C-H, O-H, Y N-H) o con grupos dobles y triples enlaces aislados. Entre $1300 - 400\text{ cm}^{-1}$ (fingerprint región) la asignación a grupos funcionales determinados es más difícil debido a la multiplicidad de bandas, pero es una zona de espectro muy útil para la identificación de compuestos específicos (ver desde Figura 15 hasta Figura 19 y desde la Tabla 13 hasta Tabla 16).

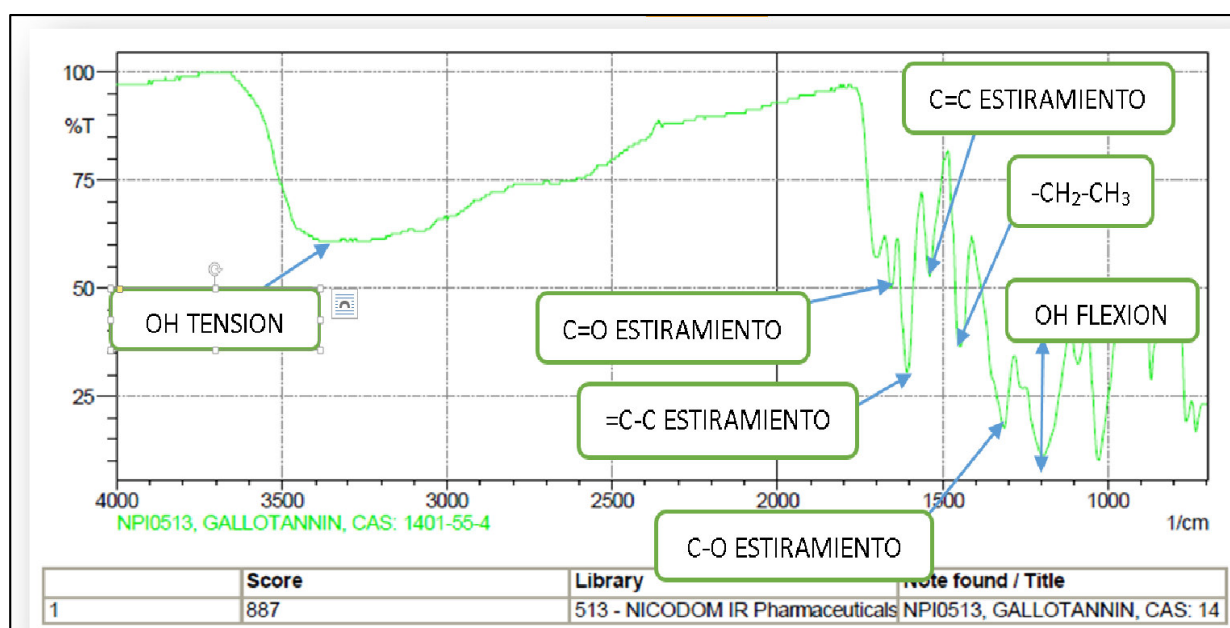


Figura 17. Espectro IR del patrón de Galatonino.

Los detalles de los espectros IR de cada extracto se muestra a continuación:

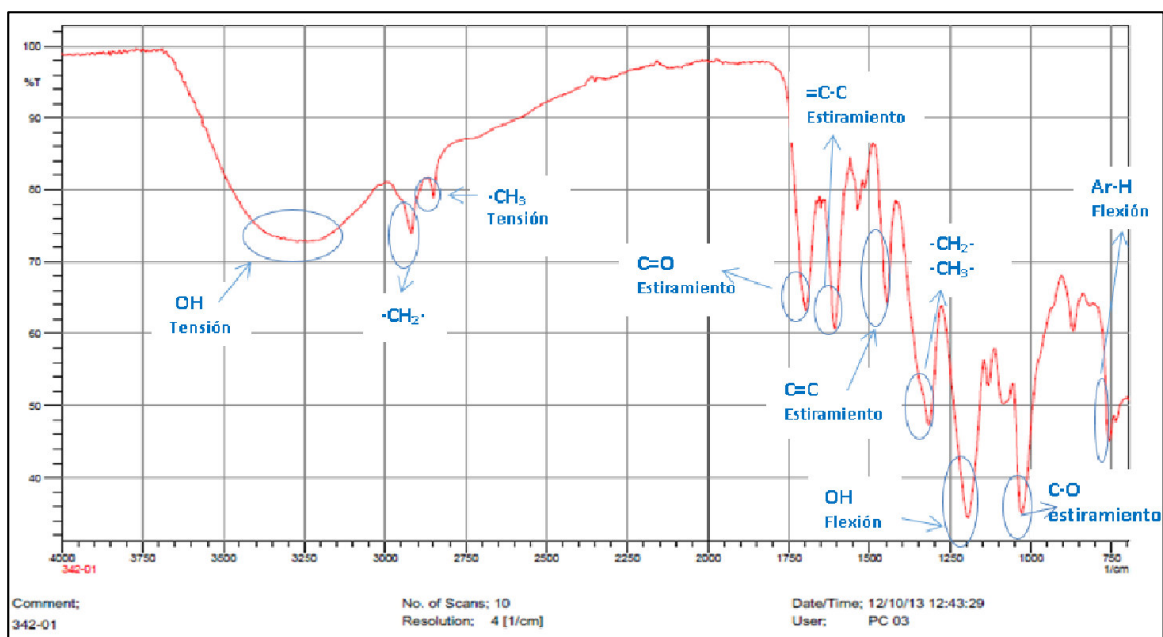


Figura 18. Espectro IR del extracto etanólico a 50°C.

Tabla 13

Extracto Etanólico a 50°C: Región de Frecuencia vs Grupos Funcionales del Espectro IR

Región de frecuencia (cm ⁻¹)	Grupos funcionales
3250	OH
2950	-CH ₂
2850	-CH ₃
1700	C=O
1600	=C-C
1450	C=C
1300	-CH ₂ -CH ₃
1200	OH
1000	C-O

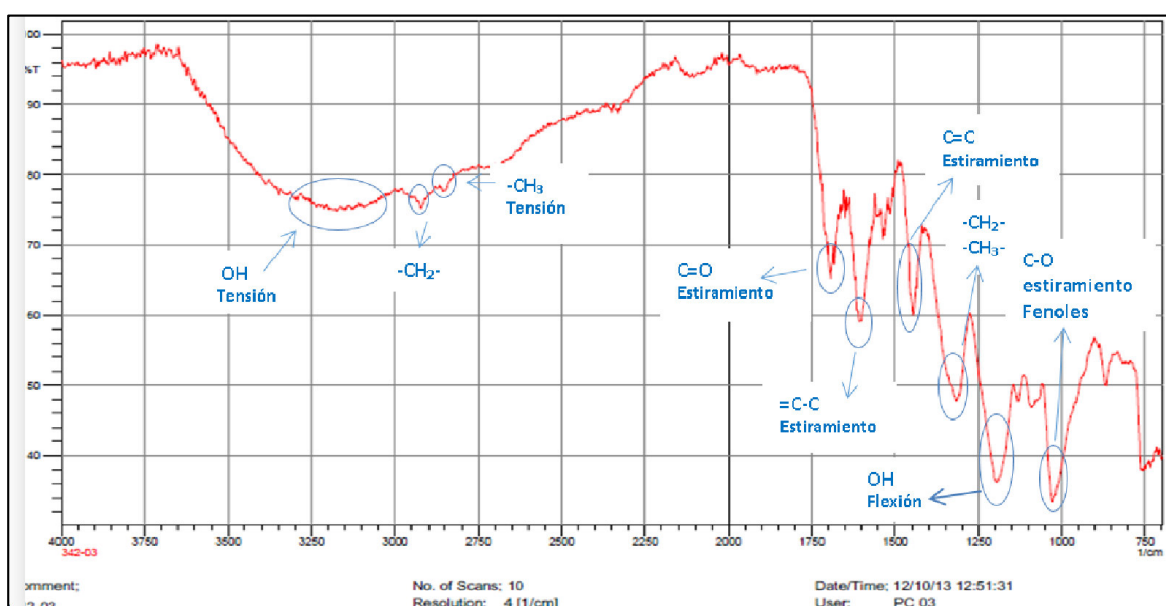


Figura 19. Espectro IR del extracto metanólico a 50°C.

Tabla 14

Extracto Metanólico a 50°C: Región de frecuencia vs grupos funcionales del espectro IR

Región de frecuencia (cm ⁻¹)	Grupos funcionales
3200	OH
2900	-CH ₂ -
2850	-CH ₃
1700	C=O
1600	=C-C
1450	C=C
1300	-CH ₂ -CH ₃
1200	OH
1050	C-O

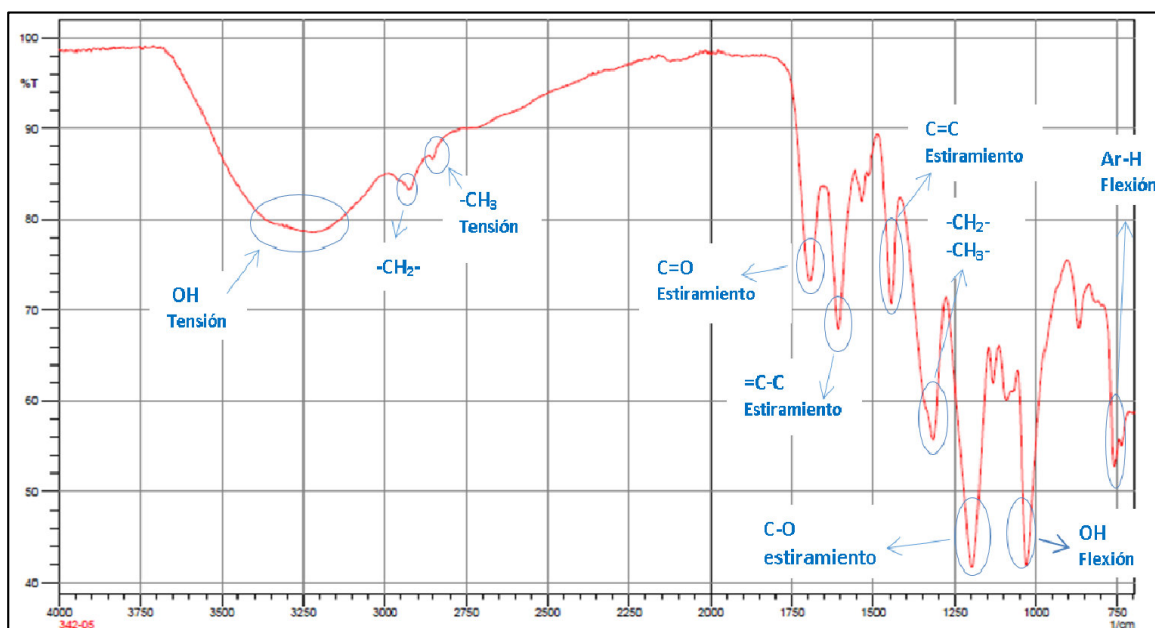


Figura 20. Espectro IR del extracto etanólico a 80°C.

Tabla 15

Extracto Etanólico a 80°C: Región de Frecuencia vs Grupos Funcionales del Espectro IR

Región de frecuencia (cm ⁻¹)	Grupos funcionales
3250	OH
2900	-CH ₂ -
2850	-CH ₃
1700	C=O
1600	=C-C
1450	C=C
1300	-CH ₂ -CH ₃
1200	OH
1050	C-O

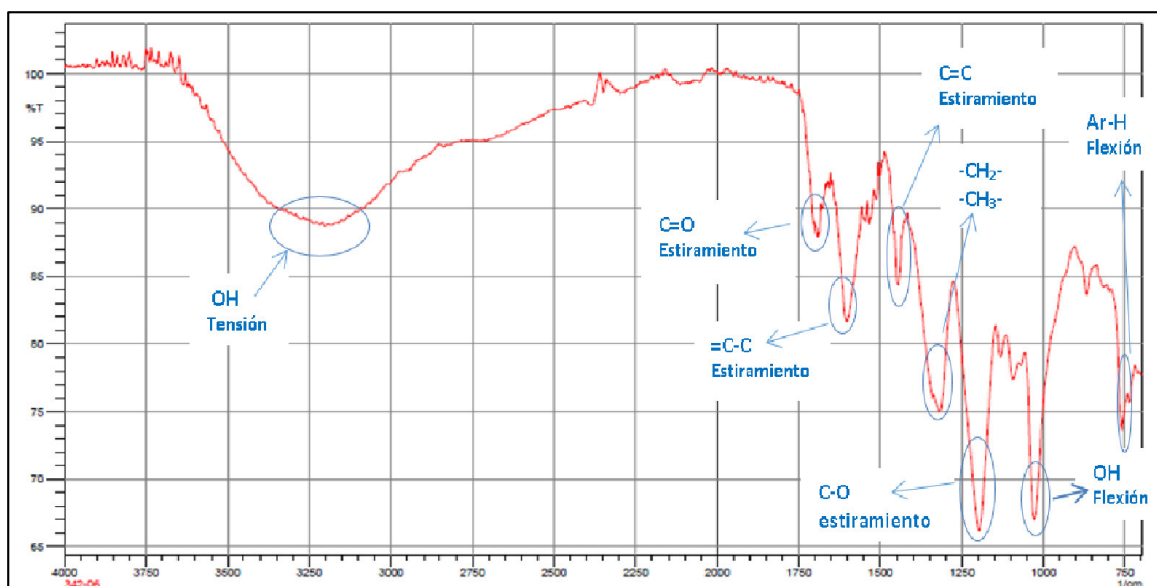


Figura 21. Espectro IR del extracto metanólico a 70°C.

Tabla 16

Extracto Metanólico a 70°C: Región de Frecuencia vs Grupos Funcionales del Espectro IR

Región de frecuencia (cm ⁻¹)	Grupos funcionales
3250	OH
1700	C=O
1600	=C-C
1450	C=C
1300	-CH ₂ -CH ₃
1200	C-O
1050	OH

4.7. Difracción de Rayos X

Esta técnica es utilizada para determinar el grado de cristalinidad, aunque en concreto la difracción de rayos X permite definir la orientación de las zonas cristalinas, y calcular las dimensiones de la red difractante. Tal es así que la difracción de rayos X, junto con los conocimientos de simetría molecular y cristalografía permiten obtener información sobre la estructura cristalográfica de los polímeros semicristalinos.

Los difractogramas obtenidos de los diferentes extractos de las hojas de tara indican que las muestras obtenidas son amorfas, ya que no muestran ningún pico angosto. Las bandas anchas observadas presentan sus máximos entre 20 a 25°C (ver Figura 22, Figura 23 y Figura 24). De todos estos difractogramas, se concluye que en los extractos de las hojas de tara no está presente ninguna especie en forma cristalina.

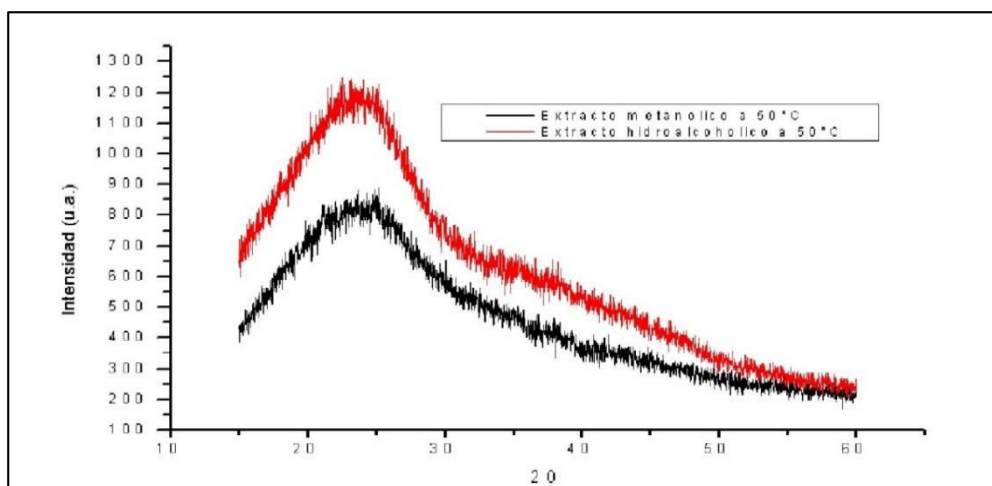


Figura 22. Difractogramas del extracto de hojas de tara etanólico e hidroalcohólico a 50°C.

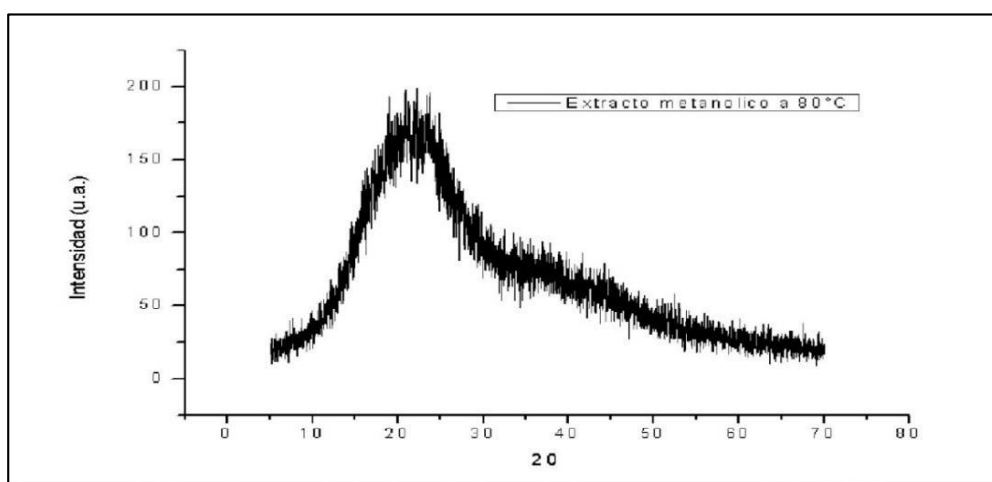


Figura 23. Difractograma del extracto de hojas de tara metanólico a 90°C.

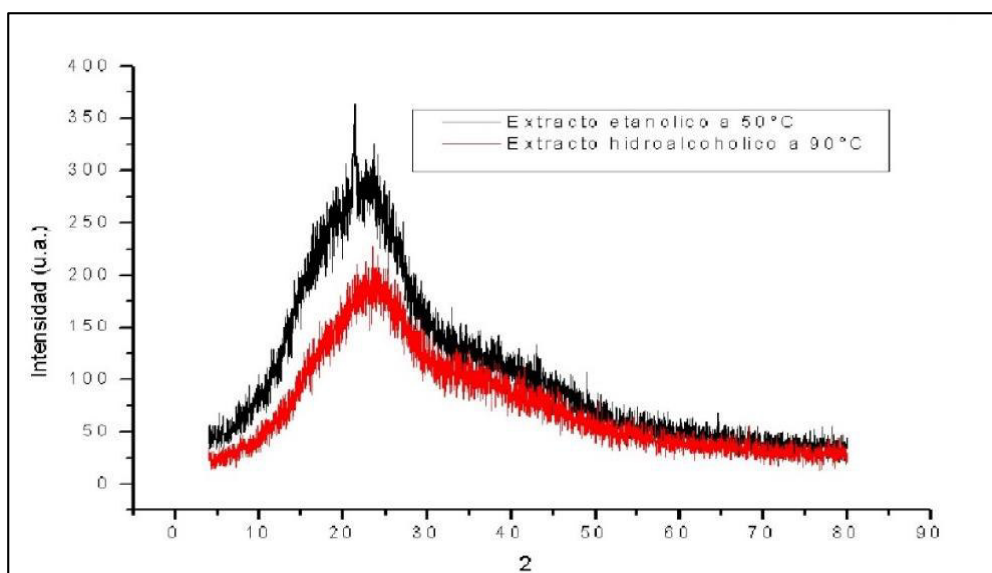


Figura 24. Difractogramas del extracto de hojas de tara etanólico a 50°C e hidroalcohólico a 90°C.

4.8. Actividad Antimicrobiana

Tabla 17

Actividad Antimicrobiana de Extractos de Hojas de Tara

COMPOSICIÓN	COD.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	OBSERVACIÓN
Extracto etanólico 50°C	1	Positivo (++) D:10mm Act. bactericida	Negativo	Negativo	Segrega Pigmentación
Extracto etanólico 70°C	2	Positivo (++) D:10mm Act. bactericida	Negativo	Negativo	Segrega poca pigmentación
Extracto etanólico 80°C	3	Positivo (+++) D: 17mm Act. bactericida	Negativo	Negativo	Segrega Pigmentación
Extracto metanólico 50°C	4	Positivo (++) D: 11mm Act. bactericida	Negativo	Negativo	Segrega Pigmentación
Extracto metanólico 70°C	5	Positivo (+++) D: 17mm Act. bactericida	Negativo	Negativo	Segrega Pigmentación
Extracto metanólico 80°C	6	Positivo (++) D: 11mm Act. bactericida	Negativo	Negativo	Segrega Pigmentación
Extracto hidroalcohólico 50°C	7	Positivo (+) D:9mm Act. bactericida	Negativo	Negativo	Segrega Pigmentación
Extracto hidroalcohólico 70°C	8	Positivo (+) D:9mm Act. bactericida	Negativo	Negativo	Segrega Pigmentación
Extracto hidroalcohólico 90°C	9	Positivo (++) D:11mm Act. bactericida	Negativo	Negativo	Segrega Pigmentación
DMSO 5%		Negativo	Negativo	Negativo	No hay pigmentación Todos fueron inhibidos como se esperaba
CONTROL (+)		Estreptomicina (10ug)	Ciprofloxacina (5ug)	Ciprofloxacina (5ug)	
CONTROL (-)		Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	

*D: Diámetro de halo de inhibición.

*Diámetro del pocillo 5mm

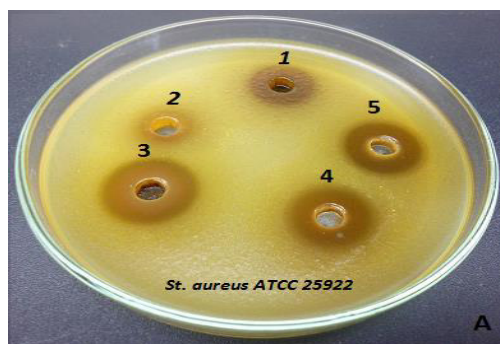


Figura 25. Cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 versus extractos: (1) Etanol 50°C; (2) Etanol 70°C; (3) Etanol 80°C; (4) Metanol 50°C; (5) Metanol 70°C.

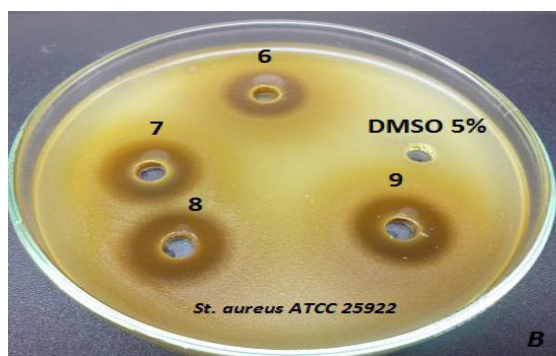


Figura 26. Cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 versus extractos: (6) Metanol 80°C; (7) Hidroalcohólico 50°C; (8) Hidroalcohólico 70°C; (9) Hidroalcohólico 90°C; (DMSO 5%) control de no inhibición del solvente.

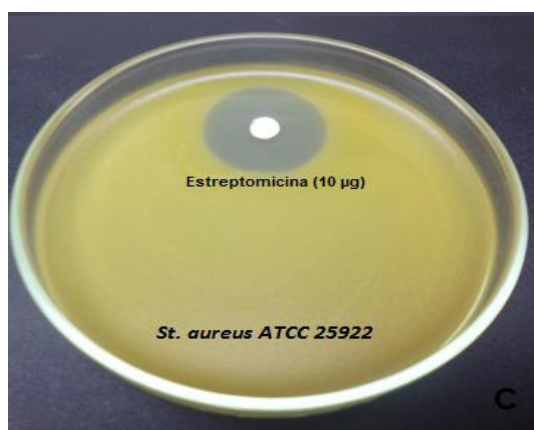


Figura 27. Cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 versus disco antibiótico de Estreptomicina (10 µg) como control de inhibición.

4.9. Concentración Mínima Inhibitoria

Se confirmó la presencia de taninos, que es el principio activo, al cual se le atribuye la propiedad antibacteriano; se han realizado estudios pero en las vainas de la tara. Se hicieron estudios de actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de las vainas y semillas de *C. spinosa* utilizando cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebselia sp.* y *Shigella flexneri*) mediante técnica de difusión en disco. Los extractos fueron preparados usando como solvente alcohol-acetona (1:1). Se observó actividad inhibitoria sobre cepas Gram positivas para el extracto de la vaina de tara más no para el de la semilla (Liu, 2002).

Los resultados experimentales se observan en la Tabla 18. En general las soluciones tuvieron actividad inhibitoria sólo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. Los

extractos obtenidos con etanol a 80°C y metanol a 70°C mostraron mayor actividad bactericida con halos de inhibición de 17 mm, seguidas de los extractos obtenidos con metanol a 50 °C, metanol a 80 °C e hidroalcohólico a 90 °C con halos de 11 mm respectivamente. Asimismo, los extractos obtenidos con etanol a 50°C y etanol a 80°C mostraron mayor actividad bactericida a CMI de 12,5 µg/mL. Todos los demás extractos tuvieron un CMI de 25 µg/mL (ver Figura 26).

Tabla 18

Concentración Mínima Inhibitoria de extractos de Hojas de Tara frente a Staphylococcus aureus ATCC 25922

Composición	Código	Concentración mínima inhibitoria µg/ml
Extracto etanólico 50 °C	1	12,5
Extracto etanólico 70 °C	2	25
Extracto etanólico 80 °C	3	12,5
Extracto metanólico 50 °C	4	25
Extracto metanólico 70 °C	5	25
Extracto metanólico 80 °C	6	25
Extracto hidroalcohólico 50 °C	7	25
Extracto hidroalcohólico 70 °C	8	25
Extracto hidroalcohólico 90 °C	9	25
	DMSO 5%	Negativo
	CONTROL de crecimiento (Ce)	Crecimiento
	CONTROL de inhibición (Ci) Eritromicina 100ug/mL	Inhibición



Diluciones (µg/mL): (A):25; (B): 12,5; (C) 6,25; (D) 3,13.
Controles: (DMSO): control del diluyente; (Cc): Control de crecimiento microbiano; (Ci): control de inhibición por Eritromicina (100 µg/mL).

Figura 28. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de hoja de tara frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25922.

Tabla 19

Actividad Antimicrobiana de Extractos de las Vainas de Tara (Avilés et al., 2010)

	Diámetro de inhibición (en mm)				
	Gram positivos		Gram negativos		
Tipo de extracto	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 25212	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Concentración del extracto
Etanólico	20	13	28	*	50 mg/ml
	16	12	27	*	25mg/ml
	15	12	23	*	12.5 mg/ml
	12	10	21	*	6.25 mg/ml
Hidroalcohólico	13	*	24	13	50 mg/ml
	12	*	21	8	25mg/ml
	11	*	18	*	12.5 mg/ml
	11	*	18	*	6.25 mg/ml
Metanólico	12	*	26	*	50 mg/ml
	9	*	22	*	25mg/ml
	*	*	20	*	12.5 mg/ml
	*	*	19	*	6.25 mg/ml
Acuoso	10	*	25	*	50 mg/ml
	7	*	23	*	25mg/ml
	*	*	21	*	12.5 mg/ml
	*	*	17	*	6.25 mg/ml

Se observa en la Tabla 19 que los extractos de las vainas de tara presentan una mejor actividad antimicrobiana frente a las diferentes cepas comparado con los extractos de las hojas de tara

4.10. Actividad Cicatrizante

El tratamiento de las heridas de quemaduras provocadas en conejos, usando los apósitos conteniendo los extractos, provocaron una reducción del área afectada en función del tiempo. Estos valores se presentan en la Tabla 20; asimismo, en la Figura 29 y Figura 30 se detalla de forma visual el comportamiento frente a las quemaduras.

Las quemaduras tienen un proceso complejo de curación, causan molestias severas y son propensas a infecciones y otras complicaciones (Alsarra, 2008). En la actualidad, la curación avanzada es la más recomendada; se realiza en un ambiente húmedo fisiológico utilizando apósitos activos como los hidrogeles, no usa tópicos en lo posible y su frecuencia

depende de las condiciones locales de la herida. El ambiente húmedo previene la desecación celular, estimula la angiogénesis y la síntesis de colágeno, favorece la migración celular y la comunicación intercelular; todos estos elementos se traducen en menos dolor, aislamiento térmico, desbridamiento autolítico, velocidad de cicatrización y calidad de cicatriz (Andeades, 2004).

Tabla 20

Área Promedio de las Heridas al día 7,14 y 21 de Tratamiento con PVA-Q, - Solución Hidroalcohólica, PVA-Q-ET 80°C, ET 80 °C, Furacina y Sin Tratamiento

ÁREA DE QUEMADURA Y PORCENTAJE DE RETRACCIÓN DE LA HERIDA SEGÚN GRUPO EXPERIMENTALES POR SEMANA DE SEGUIMIENTO						
Grupos	Semana 1		Semana 2		Semana 3	
	Área (cm ²)	Retracción (%)	Área (cm ²)	Retracción (%)	Área (cm ²)	Retracción (%)
PVA-Q –extracto etanólico a 80°C	1,86 ± 0,3	17,44	1,06 ± 0,23	53,00	0,12 ± 0,07	94,89
PVA-Q-solución hidroalcohólica	2,2 ± 0,26	2,11	1,19 ± 0,53	47,22	0,18 ± 0,12	92,22
Furacina	2,07 ± 0,05	8,22	1,31 ± 0,24	41,67	0,2 ± 0,1	91,11
Solución hidroalcohólica	1,96 ± 0,22	13,00	0,85 ± 0,18	62,11	0,17 ± 0,03	92,56
Sin tratamiento	2,1 ± 0,08	6,67	1,63 ± 0,24	27,56	0,53 ± 0,34	76,44
p - Value	Anova	0,448	Anova	0,158	Anova	0,125
Comparaciones simultáneas al 95% de confianza	Tukey	Sin diferencias	Tukey	Sin diferencias	Tukey	Sin diferencias
	Fisher	Sin diferencias	Fisher	Difiere: sin tratamiento	Fisher	Difieren: furacina y sin tratamiento
	Dunnet	Sin diferencias	Dunnet	Sin diferencias	Dunnet	Sin diferencias
Los p-value de ANOVA de un factor son mayores a 0,05 por tanto al menos 1 de los tratamientos es diferente del resto. No se encuentran diferencias significativas para las pruebas de Tukey en las semanas 1, 2 y 3. Para las pruebas de comparación de Fisher en la semana 2 y 3 los resultados más bajos son el tratamiento con Furacina y el grupo control Sin tratamiento. Para la prueba de Dunnet que compara los tratamientos frente a un control (Sin tratamiento), los otros 4 tratamientos presentan resultados similares, sobresaliendo en la Semana 3, el mejor tratamiento es: PVA-Q -extracto etanólico a 80°C						

Varios estudios han investigado los efectos de la aceleración de la cicatrización de la herida abierta por quitina y quitosano en varios modelos animales, la mayoría de los resultados se consideraron concluyentes. La curación de las heridas, en muchos casos, fueron atribuido a los agentes antimicrobianos, como alginato, gelatina o heparina (Alsarra, 2008; Andeades, 2004; León, 2007).

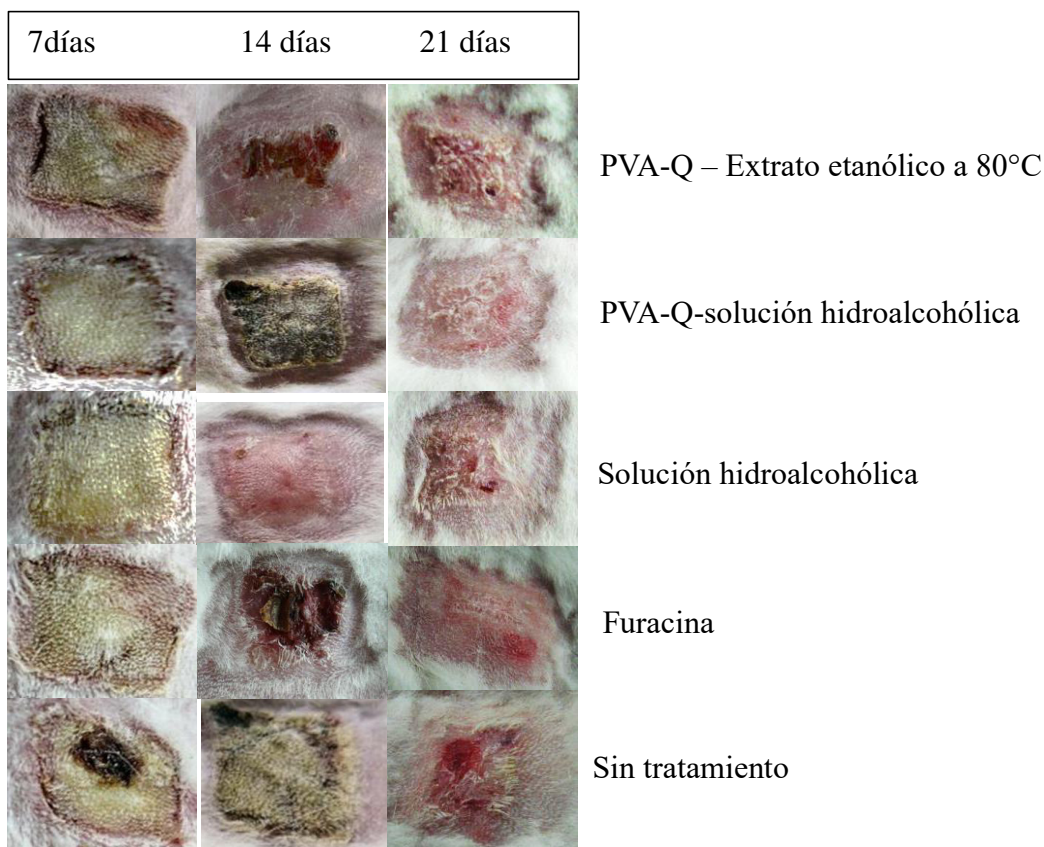


Figura 29. Evolución de las áreas quemadas al día 7, 14 y 21 luego del tratamiento con PVA-Q-Extracto hidroalcohólico 80°C, PVA-Q-Soluc. Hidroalcohólica, solución de extracto hidroalcohólico 80°C, furacina y sin tratamiento.

El objetivo de esta parte fue determinar el efecto de la aplicación de apósitos de PVA-Q Extracto etanólico a 80°C de las hojas de tara sobre quemaduras realizadas en la piel de conejos, y compararla con el hidrogel (PVA Q) embebida con solución hidroalcohólica, de las hojas de tara, sin tratamiento, y furacina un medicamento de venta comercial que tiene un agente antimicrobiano utilizado para el tratamiento de quemaduras. El principal factor en la aceleración del proceso de cicatrización de la herida cuando se usa hidrogel de PVA-Q se atribuye a la presencia de N-acetil-D-glucosamina (Okamoto, 1995), componente importante de la matriz extracelular de los tejidos, su alta solubilidad y rápida absorción por los tejidos permite la aceleración de la cicatrización de la herida, el quitosano se convierte en una fuente continua de N-acetil- D-glucosamina, siempre y cuando la herida contenga células inflamatorias liberando lisozima. Las reacciones inflamatorias y por lo tanto la liberación de

lisozima continúan hasta que la herida esté curada (Probaharan, 2006). A los 14 días este componente disminuye para dar paso a la actividad de los fibroblastos quienes producen colagenasa que está relacionado con la remodelación de la herida en el proceso de curación.

Se puede observar que el tratamiento con PVA-Q adicionado al extracto etanólico de tara tiene un comportamiento retractor del área afectada por las quemaduras superior a la solución hidroalcohólica, extracto de Tara y a la Furacina; sin embargo, no existen diferencias significativas mostrando que la eficiencia de los tratamientos es similar, pero superior al grupo que no recibió tratamiento (Tabla 19: 94.89% de retracción para el PVA-Q + extracto etanólico de Tara, 92.22% PVA-Q extracto hidroalcohólico, 91.11% para la furacina y 92.56% para el extracto de Tara vs. 76.44% del grupo control), la tasa de recuperación de los tejidos afectados puede atribuirse al N-acetil-D-glucosamina que es suministrado constantemente por el quitosano de los primeros grupos de tratamiento y que puede encontrarse en el extracto de Tara para la extracción utilizada, esto también significa que el extracto de tara puede reemplazar efectivamente los tratamientos con quitosano para la reducción de heridas que implican un proceso de cicatrización.

La Figura 29 muestra gráficamente la efectividad del tratamiento del extracto de tara durante los días de observación y cómo el extracto muestra actividad cicatrizante y de retracción de quemaduras similar al observado en el grupo de tratamiento con PVA-Q + extracto etanólico de Tara, es importante resaltar que para el día 14, el porcentaje de retracción supera al resto de tratamientos analizados y finalmente para el día 21 la tasa de recuperación supera el 90% de retracción del área de la herida, es decir que permite una cicatrización a mayor velocidad alcanzando la eficiencia del tratamiento con quitosano, permitiendo apreciar que el extracto de Tara es suficiente para poder tratar heridas por quemaduras.

Analizando las fotografías de la Figura 30 se observa el mismo comportamiento de los extractos tanto el etanólico como el hidroalcohólico muestran la superficie de la herida en mejores condiciones que la de furacina y sin tratamiento en la segunda semana y en a los 21 días los tres primeros tratamientos las heridas muestran casi una total recuperación incluso puede observarse la presencia de folículos pilosos.

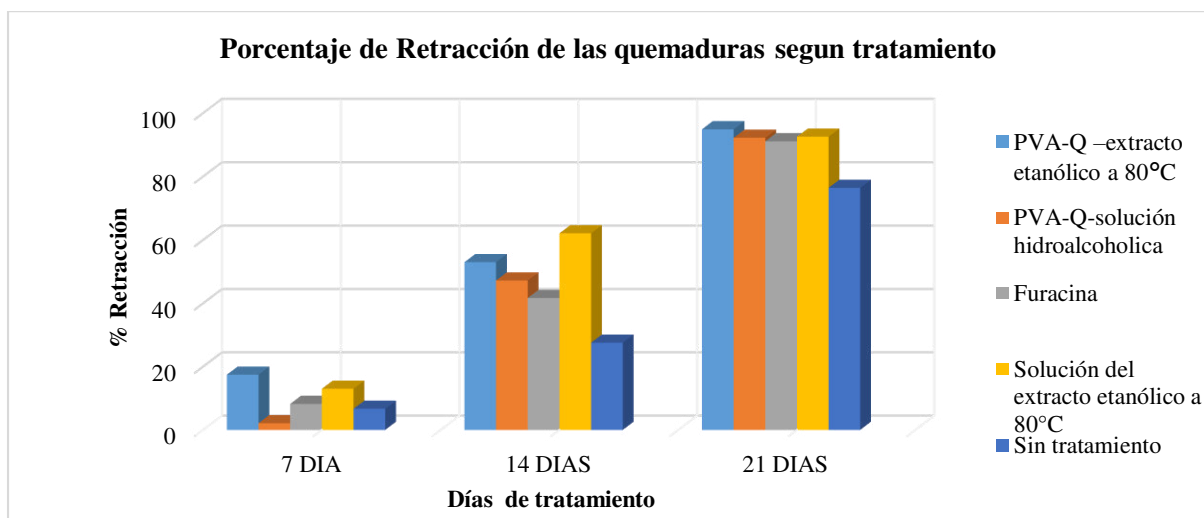


Figura 30. % Retracción vs Tratamiento.

Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

- (i) Los extractos de tara presentan diferente rendimiento de extracción según el solvente utilizado. Para efectos de la presente investigación se utilizó etanol, metanol y una mezcla hidroalcohólica. Asimismo, se observó que a mayor temperatura existe un mayor rendimiento, esto se cumple en los tres solventes utilizados. En el análisis fitoquímico se encontró taninos en mayor cantidad que saponinas y flavonoides.
- (ii) En todos los extractos están presentes especies polifenólicas, lo que se pone en evidencia en los espectros IR, en donde se observan la banda ancha del OH perteneciente a los grupos OH de los fenoles. Se observó que el extracto que contiene la mayor cantidad de polifenoles es el obtenido con metanol a 50 °C (477,36 mg EAG/g de muestra). En los otros extractos el contenido de polifenoles varía entre 457,36 y 423,72 mg EAG/g de muestra.
- (iii) La mayor capacidad antioxidante se encontró en el extracto etanólico a 80 °C ($IC_{50} = 6,325 \mu\text{g/mL}$). En los otros extractos el IC_{50} varía entre 19,16 y 430,05 $\mu\text{g/mL}$.
- (iv) El extracto metanólico a 50 °C fue el presentó mayor porcentaje de taninos totales (17,98%), de taninos hidrolizables (16,18%), y taninos no hidrolizables (1,94%).
- (v) Por Difracción de Rayos X se determinó que la tara tiene característica amorfa con cierto grado de cristalinidad.
- (vi) En las pruebas de actividad antimicrobiana, los extractos mostraron actividad inhibitoria sólo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, más no frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Los extractos etanólico a 80 °C y metanólico a 70 °C mostraron mayor actividad bactericida, con halos de inhibición de 17 mm. Respecto a los otros extractos, estos mostraron halos de 11 mm. En la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI),

los extractos etanólico a 50 °C y 80 °C mostraron mayor actividad bactericida, con una CMI de 12,5 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. Todos los demás extractos tuvieron un CMI de 25 µg/mL.

- (vii) El tratamiento con PVA-Q adicionado al extracto etanólico de tara tiene un comportamiento retractor del área afectada por las quemaduras superior a la solución hidroalcohólica, extracto de Tara y a la Furacina; sin embargo, no existen diferencias significativas mostrando que la eficiencia de los tratamientos es similar, pero superior al grupo que no recibió tratamiento

5.2. Recomendaciones

- (i) Realizar pruebas de extracción con otros solventes y a diferentes temperaturas menores a 50°C para hacer una comparación.
- (ii) Buscar métodos cromatográficos para cuantificar el % taninos existentes en los extractos de las hojas de tara.
- (iii) Realizar pruebas con otros solventes y observar la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de tara.
- (iv) Comparar con otros métodos la determinación de actividad antioxidante de los extractos de las hojas de tara.
- (v) Muestreo de las hojas antes de la época de floración de la planta.

Referencias

- Alsarra I. (2008). Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *Int. J. Biol. Macromol.* 45, 16-21.
- Añanca, E. (2009). *Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de Caesalpinia spinosa (tara) en cepas de Staphylococcus aureus y Stmptococcus pyogenes* (Tesis de grado), Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.
- Andrades P., Sepúlveda S. & Gonzáles, J. (2004). Curación avanzada de heridas. *Rev. Chilena de Cirugía*, 56(4), 396-403.
- Araujo, J, Cordova, B, & Rodriguez, M. (2003), Cuantificación de la actividad antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* contra *Staphylococcus aureus*. Documento presentado en el *II Congreso Peruano de Plantas Medicinales y Fitoterapia*. Lima, Perú.
- Ávalos A., & Pérez E. (2009). Reduca (Biología). Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Avilés, R., Carrión, J., Huamán, J., Bravo, M., Rivera, D., Rojas, N., & Santiago, J. (2010). Actividad antioxidante, polifenoles totales y contenido de taninos de extractos de tara (*Caesalpinia spinosa*). *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.*, 13(2), 5-11.
- Avilés, R., Rojas, N., Aponte, J., León, J., Carrión, J., & Santiago, J., (2012). Utilización de extractos de tara (*Caesalpinia spinosa*) en la formulación de apósitos para el tratamiento de quemaduras. Documento presentado en *el XXVI Congreso Peruano de Química, Arequipa, Perú 17 al 19 de octubre*.
- Cabello L., (2009). *Monografía de Tara Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze*.
- Carhuapoma, W., & Santiago, J. (2005). Preparación de hidrogeles de quitosano-PVA por radiación gamma. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 71, 185-192.

- Carretero, M. (2000). Plantas medicinales. *Panorama Actual Med*, 24(235), 633-636.
- Cohn, D., & Sosnik, A. (2005). Smart Hydrogels for in Situ Generated Implants. *Biomacromolecule*, 1168-1170.
- Cotrado, A. (2009). Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) en cepas de *Staphylococcus Aureus* y *Streptococcus Pyogenes* (Tesis de grado), Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman, Tacna, Perú.
- De La Cruz P., (2004). Aprovechamiento integral y racional de la Tara (*Caesalpinia spinosa* *Caesalpinia tinctoria*). *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG*, 7(14), 64-73.
- Dominguez, X. (1973). *Método de Investigación Fitoquímica*. México: Limusa.
- Douglas, A. Skoog. (2000). *Principios de Análisis Instrumenta*. (5th Ed.). New York: McGraw-Hill, pp. 354-356.
- Estudio de Mercado de Tara (2008). *Elaborado para SIPO por Profound - Advisers in development Dic*. Recuperado de <https://docplayer.es/6820816-Estudio-de-mercado-tara-caesalpinia-spinosa.html>
- Fernández, A. (2008). *Estudio de las propiedades antioxidante de un extracto súper crítico de la vaina de la tara (Caesalpinia spinosa) para su uso potencial como aditivo alimentario* (Tesis de grado), Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- Ferreira, J. (2005). Inhibitory effect of Cesalpinia Spinosa leaflets crude extracto on Fusarium Solani and Phoma tarda. *Mestrado en Biotecnologia*. UNINCOR.
- Ferrerira. J., Cardoso. M., & Estevao de Souza. P. (2005). Inhibitory Effect of *Caesalpinia spinosa* Leaflets Crude Extract of *Fusarium Solanki* and *Phoma tarda*. *Acta Scientarium Biological sciences*, 27(2), 185-188. doi: 10.4025/actascibiolsci.v27i2.1329
- Gibaja, S. (1985). Pigmentos Naturales Quinónicos, Fondo Editorial UNMSM.

- Gibaja, S. (1996). Guía de los Compuestos de Carbono, Fondo Editorial UNMSM.
- Gruner, E., Barna, S., Tate, M., Rossi, G., Wixted, P., & Sellin, R. (1998). A Pixel-Array Detector for Time-Resolved X-ray Diffraction, *Journal of Synchrotron Radiation*, 252-255.
- Guía para Análisis de muestra para Infrarrojo (2003). Caracas Universidad Central de Venezuela, Escuela de Química Facultad de Ciencias Instrumental Analítica.
- Guija, E., Inocente M., & Zarzosa, N. (2015). Evaluación de la Técnica 2,2 Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte médico* 15(1), 57-60.
- Guiza, D., & Rincón L. (2007). *Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Minthostachys mollis combinado con inactivación térmica, sobre cepas de Listeria monocytogenes y Bacillus cereus*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá.
- Hallwell, B., & Gutteridge J. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125-126.
- Iannacone, J., Ayala, H., Román, A (2005). Efectos toxicológicos de cuatro plantas sobre el gorgojo del maíz *Sitophilus Zeamais* Motschulsky 1855 (Coleoptera: Curculionidae) y sobre el gorgojo de las galletas *Stegobium Paniceum* (Linnaeus 1761) (Coleoptera: Anobiidae) en Perú. *Gayana*, 69(2), 234-240.
- Infantes, A. (2004). *Tratamiento de la gingivitis marginal crónica con pasta dental de Caesalpinia spinosa (Molina) kuntze "tara" en niños de 8 a 10 años* (Tesis de grado), Universidad San Martín de Porres, Lima, Perú.
- Issa, A. (2003). Hidrogeles inteligentes. *Grupo de nuevos materiales de la Universidad del País Vasco*, 10-14.

- Larez, C. (2003). Algunos usos de quitosanos en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 91-95.
- Lastra, H, Rodriguez, E., Ponce de León, H., & Gonzalez, M. (2000). Método Analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(1), 17-22.
- Lastra, H., Rodríguez, E., & Ponce de León, H. (2000). Método Analítico para la Cuantificación de Taninos en el Extracto Acuoso de Romerillo. *Rev. Cubana Plant. Med.*, 5(1), 17.
- León, J., Montero, S., Albán, J., Tomas, G., Aponte, J., & Noceda, M. (2011). Actividad antimicrobiana de tres especies vegetales de uso en medicina natural peruana. Documento presentado en el XIX Reunión Científica ICBAR, Lima, Perú, 120.
- León, K., & Santiago, J. (2007). Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 73(3), 158-165.
- Liu, H., Lengua, L., León, G., La Torre, C., Huapaya, J., & Chauca, J. (2002). Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de "Caesalpinia spinosa tara" y Eucalyptus sp. "eucalipto". *Revista Horizonte Medico*, 2(1), 2.
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales* (2nd Ed.). Lima, Perú.
- López E. (2007). *Estudio fitoquímico y aproximación genética en especies de la sección PLINTHINE del Género Arenaria (Caryophyllaceae) (Tesis de grado)*, Universidad de Granada, Andalucía, España
- López, C. (1998). Acción antimicrobiana *Caesalpineae tintórea* (Molina) Kuntze o Tara de diferentes regiones del Perú. *Ciencia e investigación*, 1(1) 27-31.

- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin. J. Sci. Technol.*, 26(2), 211-219.
- Nomura, T., Kikuchi M., Kubodera, A., & Kawakami, Y. (1997). Proton – donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1, 1-Diphenyl -2- Picrylhydrazyl (DPPH). *IUBMB Life*, 42(2), 361-370.
- Okamoto, Y., Tomita, T., Minami, S., Matsushashi, A., & Kumazawa, N. (1995) Effects of chitosan on experimental abscess with *Staphylococcus aureus* in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 57, 765-767.
- Pandolhni, T., Gabriel, L., & Comparini, C. (1992). Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant. Cell and Environment*, 15, 719-725.
- Prabaharan, M., & Mano, J. (2006) Stimuli-responsive hydrogels based on oligosaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials. *Macromol. Biosci.*, 8, 991-1008.
- Reynel, C. & León, J. (1990). Árboles y Arbustos Andinos para Agroforestería y Conservación de suelos. Tomo I y II Proyecto FAO/Holanda. Lima 120 pp
- Rodas, R., Ohnuki, T., Mathor, M., & Lugao. A. (2005). Irradiated PVA Membrane Swelling with Chitosan Solution as Dermal Equivalent. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 536-539.
- Rodriguez, O., Torrenegra, R., & Bustos, D. (2007). *Actividad antimicrobiana de Cuphea billata Ruiz & Pav. (Lythraceae)* *Scientia Et Técnica*. Universidad Tecnológica de Pereira, XIII(33), 259-60.
- Rojas N., Avilés R., Villacaqui E., Neira E., Ramos W., & Santiago J. (2011). Tratamiento de quemaduras con películas obtenidas por radiación gamma que contienen extracto hidroalcohólico de tara (*Caesalpinia spinosa*) en animales de experimentación”. *Dermatología Peruana*, 21(1).

- Rojas, D., Narváez, E., & Restrepo, L. (2010). *Evaluación del contenido de vitamina C, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (Psidium guajava L.) de las variedades pera, regional roja y regional blanca.*
- Rojas, J. (1998). *Estudio clínico experimental del tratamiento de la gingivitis crónica con Caesalpineia spinosa (Molina) Kuntze- "TARA" centro de salud Max Arias Shereiber.*
- Rojas, N., Avilés, R., Villacaqui, E., Neira E., Ramos, W., Santiago, J. (2010). Tratamiento de quemaduras con películas obtenidas por radiación gamma conteniendo extracto hidroalcohólico de tara (*Caesalpinia spinosa*). Documento presentado para el XVIII Congreso Nacional de Biología.
- Sáez, V., Hernáez, E., & Angulo, L. (2003). Liberación controlada de fármacos. Hidrogeles, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 21-28.
- Sandoval, M., Charbonnet, R., Okuhama, N., Roberts, J., Krenova, Z., Trentacosti, A., & Miller, M. (2000). Cat's claw Inhibits TNF α Production and Scavenges Free Radicals: Role in Cytoprotection. *Free Rad. Biol. Med.*, 29, 71-78.
- Valencia, M., & Robles, Sardin, A. (2005). El valor nutrimental y protector de las frutas y verduras en la dieta humana. En González -Aguilar G.A. Gardea, A.A. y Cuamea - Navarro, F. (Eds.) *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados. Logiprint Digital. Guadalajara, México*, 1-14.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., & Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Vásquez, A., Cala, M., Miranda, I., Tafurt, G., Matinez, J., & Stashenki, E. (2007). Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens resptons* y *Montanoa ovalifolia*, *Scientia et Technica*, 33, 205 -207.

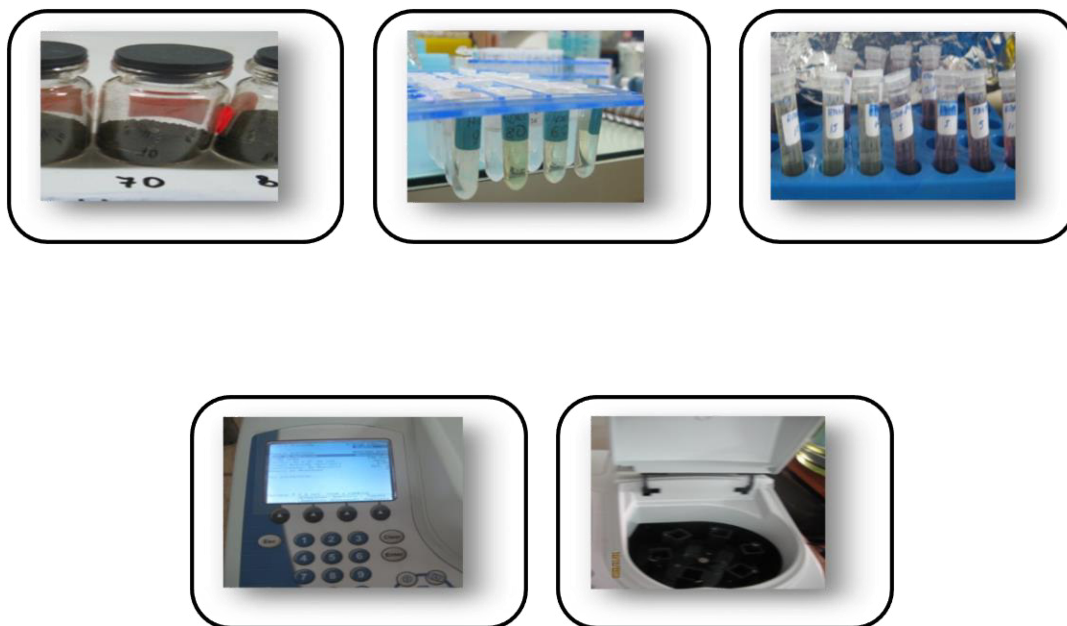
- Velandia, D. (2009). *Evaluación de la actividad cicatrizante y caracterización fitoquímica de Dracontium croati* (Tesis de maestría), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Waterhouse, A. (2012). Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in wine Andrew Waterhouse, Departament of Viticulture & California.
- Yoksan, R., Akashi, M., & Mikiji, M. (2004). Optimal γ -Ray Dose and Irradiation Conditions for Producing Low-Molecular-Weight Chitosan that Retains its Chemical Structure. *Radiation Research Society*, 471-479

Apéndices

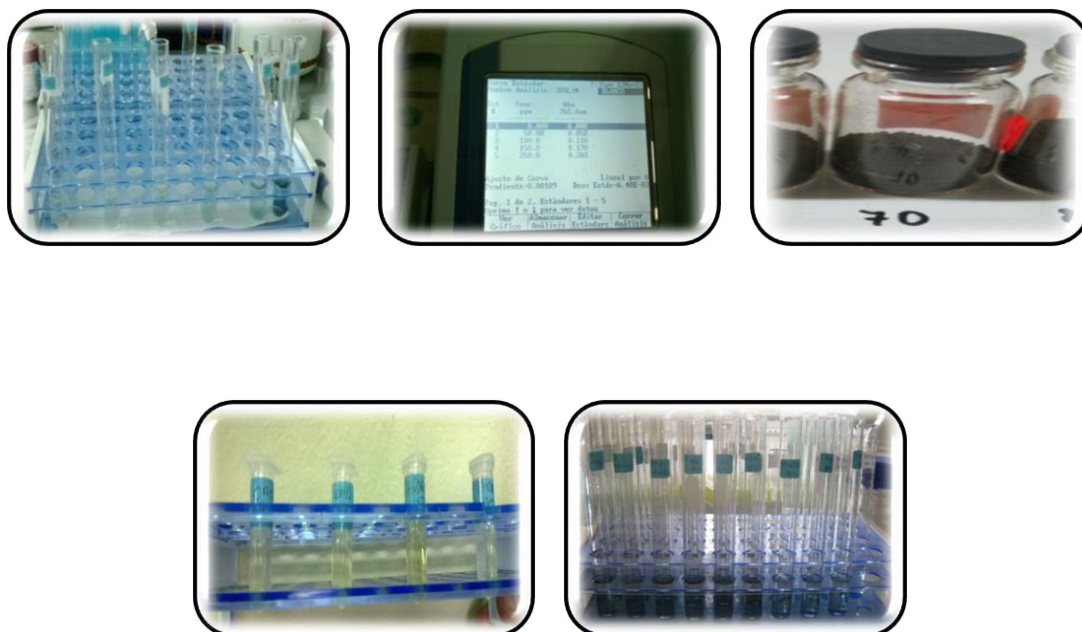
Apéndice A: Obtención de Extractos de las Hojas de Tara



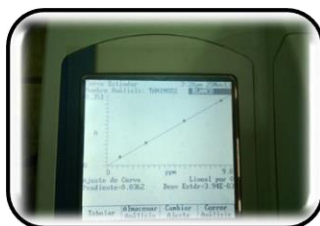
Apéndice B: Método de DPPH



Apéndice C: Polifenoles

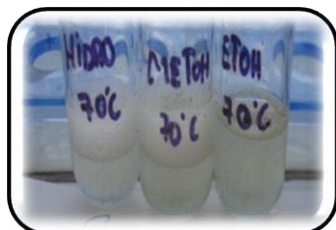


Apéndice D: Determinación de Taninos Totales

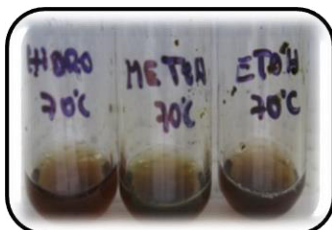


Apéndice E: Marcha Fitoquímica

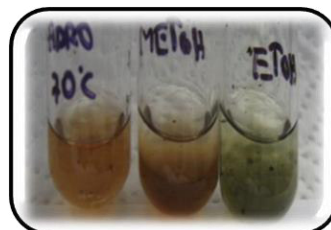
1. Determinación de Saponinas



Prueba de espuma



Reactivo de
Salkowski

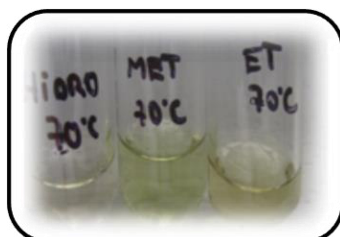


Variante de reacción
de Salkowski

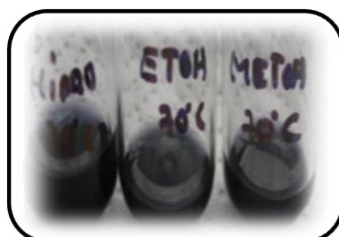


Reacción de
Lieberman-Burchard

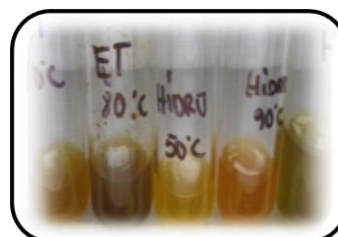
2. Determinación de Flavonoides



Shinoda

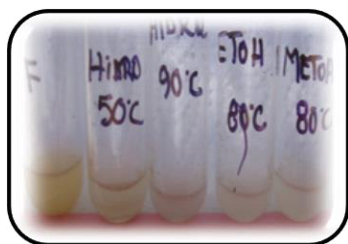


Reacción con cloruro
férico



Reacción con NaOH

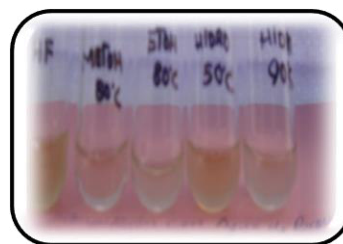
3. Determinación de Taninos



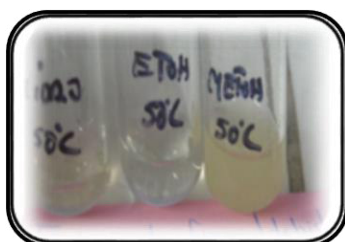
Reacción de gelatina-cloruro de sodio



Reacción con cloruro férrico



Reacción con agua de bromo

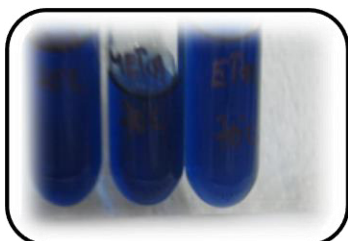


Reacción con formaldehído



Reacción con acetato de plomo

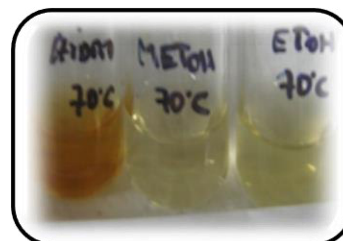
4. Determinación de Antocianinas



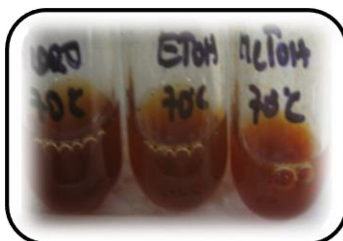
Reacción Fehling (A y B)



Reacción con NaOH 10%

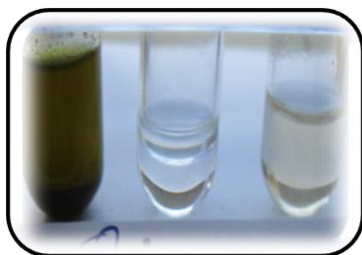


Reacción HCl 1N



Reacción con cloruro férrico

5. Determinación de Quinonas

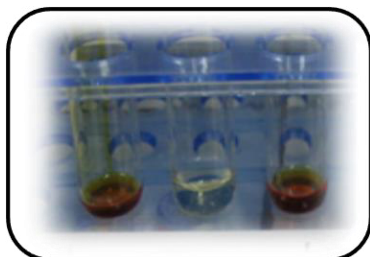


Quinonas

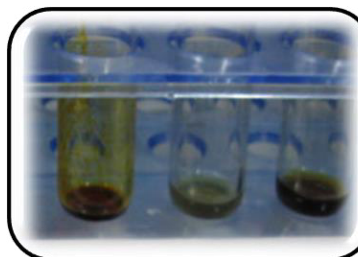


Quinonas -
Antraquinonas

6. Determinación de Alcaloides

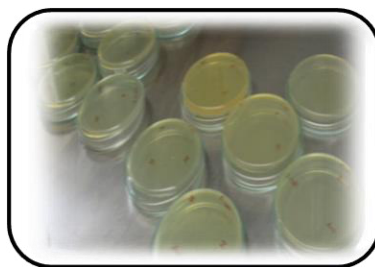
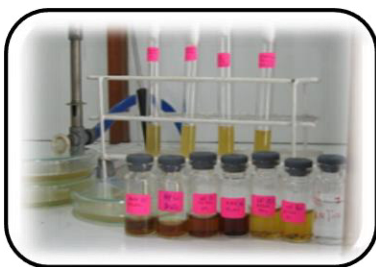


Solución acuosa ácida de
HCl 1N



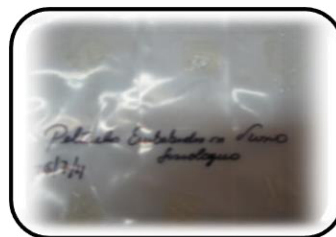
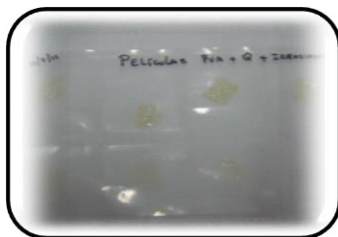
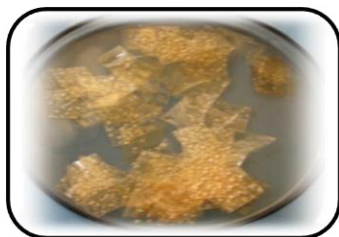
Solución etanólica ácida
de HCl 1N

Apéndice F: Actividad Antimicrobiana



Apéndice G: Actividad Cicatrizante

1. Actividad Cicatrizante (Parte I)



2. Actividad Cicatrizante (Parte II)



Apéndice H: Ejemplos de Cálculos de los Diferentes Métodos

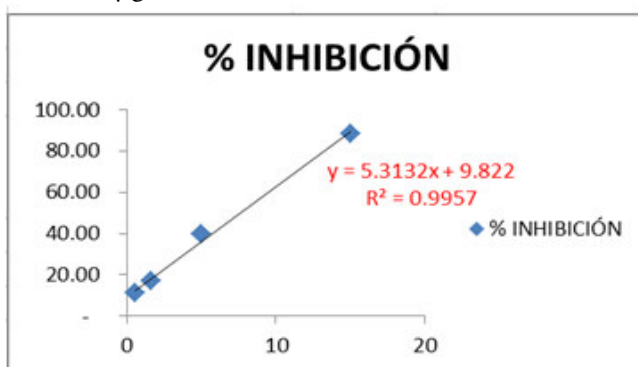
1.- Cálculos de IC₅₀ de la Actividad Antioxidante

Concentración	% Inhibición
15	88.55
5	39.85
1.6	16.95
0.5	11.36

$$Y = 5.3132 X + 9.822$$

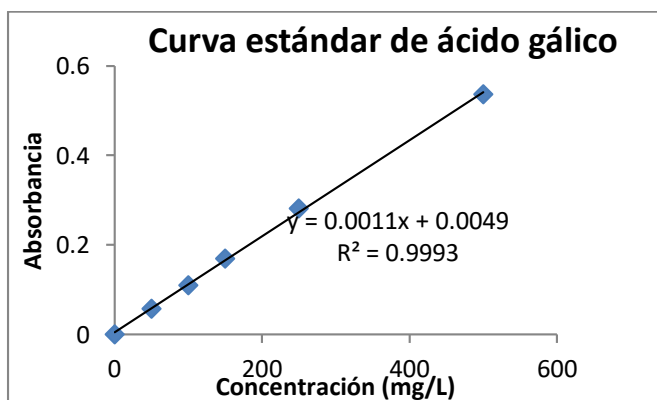
$$IC_{50} = ((88.55/2) - 9.822) / 5.3132$$

$$IC_{50} = 6.48 \mu\text{g/mL}$$



2.- Cálculos de Polifenoles

CONCENTRACIÓN (mg/L)	ABSORBANCIA
0	0
50	0.058
100	0.11
150	0.17
250	0.281
500	0.536



METOH 50°C Absorbancia
0.53

$$Y = 0.0011 X + 0.0049$$

$$X = ((0.53 - 0.0049) / 0.0011)$$

$$X = 477.36$$

$$477.36 \text{ mg AG/mL} * 1\text{L}/1000\text{mL} = 0.47736 \text{ mg AG/mL extracto}$$

$$0.47736 \text{ mg AG/mL extracto} * 1\text{ml VT}/0.1 \text{ mL extracto} = 477.36 \text{ mg AG/mL extracto}$$

$$477.36 \text{ mg AG/mL extracto} * 2.5 \text{ mL extracto} / 0.025 \text{ muestra} = 477.36 \text{ mg AG/1g muestra}$$